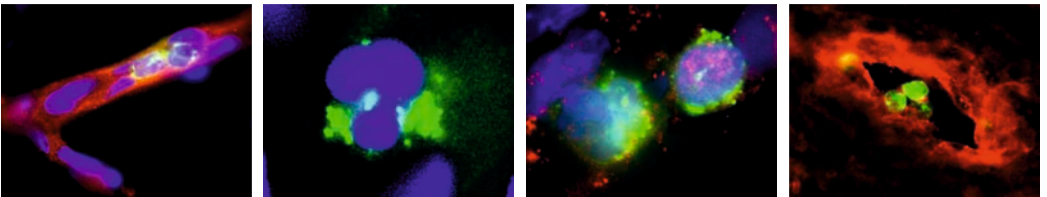


Hanna Schweighöfer

Effekte einer Vagusnervstimulation auf neurophysiologische
Parameter und die zelluläre Immunantwort im Gehirn der
Ratte während einer systemischen Entzündungsreaktion



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und der
Klinik für Neurologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH

Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Rosengarten

**Effekte einer Vagusnervstimulation auf neurophysiologische
Parameter und die zelluläre Immunantwort im Gehirn der Ratte
während einer systemischen Entzündungsreaktion**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Hanna Schweighöfer

Tierärztin aus Biberach an der Riss

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Joachim Roth

Prof. Dr. Bernhard Rosengarten

Tag der Disputation: 26.02.2016

I.	Einleitung	6
1	Bedeutung der Sepsis	6
1.1	Definition	6
1.2	Inzidenz	7
1.3	Pathophysiologie der Sepsis und der LPS induzierten systemischen Inflammation	8
2	Humoraler Weg der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn	11
2.1.1	Die Blut-Hirn Schranke	12
2.1.2	<i>Circumventrikuläre Organe (CVOs) und Plexus choroideus</i>	13
2.2	Transkriptionsfaktoren	15
2.2.1	NFκB und IκBα	15
2.2.2	STAT3 und SOCS3	16
2.2.3	NF-IL6	17
3	Zellulärer Weg der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn	18
3.1	Rekrutierung von Immunzellen	18
3.1.1	Diapedese	18
3.1.2	Leptin	20
3.2	Immunzellen des Gehirns	20
3.2.1	Mikroglia	21
3.2.2	Monozyten / Makrophagen und Mastzellen	22
3.2.3	Lymphozyten	22
3.2.4	Neutrophile Granulozyten	24
4	Neuronaler Weg der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn	25
4.1	Vagale Afferenzen	25
4.2	Der cholinerge anti-inflammatorische Weg	26
5	Sepsis assoziiertes Delirium	28
6	Mikrozirkulation	31
6.1	Die Neurovaskuläre Einheit	31
6.2	Neurovaskuläre Kopplung – bedarfsadaptierte Durchblutung	32
6.3	Pathophysiologie der Mikrozirkulation	34
7	Ziel der Arbeit	35

II.	Material und Methoden	38
1	Verwendete Materialien allgemein	38
2	<i>In vivo</i> Versuch	39
2.1	Materialien für den Tierversuch	39
2.2	Versuchstiere	41
2.3	Versuchsprotokoll	42
2.4	Operative Präparation der Versuchstiere	43
2.4.1	Inhalationsnarkose	43
2.4.2	Kanülierung der <i>Arteria</i> und <i>Vena femoralis</i>	43
2.4.3	Injektionsnarkose und Muskelrelaxation	44
2.4.4	Tracheotomie, Intubation und Beatmung	45
2.4.5	Präparation des <i>Nervus vagus</i>	45
2.4.6	Schädelpräparation	46
2.4.7	Die Laser-Doppler-Flussmetrie – Erfassung des evozierten Blutflusses	47
2.4.8	Erfassung der SEPs	49
2.5	Übersicht über den Versuchsaufbau	52
2.6	Zeitlicher Versuchsablauf	53
2.7	Probennahme und biologisches Material	54
2.8	Blutuntersuchungen	55
3	Immunhistologie	55
3.1	Herstellung der Gefrierschnitte	55
3.2	Grundlage der Methode	56
3.3	Materialien für die Immunhistochemie	57
3.4	Antikörper	59
3.4.1	Primäre Antikörper	59
3.4.2	Sekundäre Antikörper	60
3.4.3	Kernfärbungen – Gegenfärbung	60
3.5	Arbeitsprotokoll	60
3.5.1	Immunfluoreszenz	60
3.5.2	DAB-Färbung	61
3.6	Mikroskopie	62
3.7	Quantifizierung der Ergebnisse	63

3.7.1	Neutrophile Granulozyten	63
3.7.2	ICAM-1	64
3.7.3	Kolokalisation neutrophiler Granulozyten und ICAM-1	65
3.7.4	NF-IL6	66
3.7.5	T-Lymphozyten	67
4	PCR	67
4.1	Grundlage der Methode	67
4.2	Materialien für die PCR	69
4.3	RNA Extraktion	70
4.4	Reverse Transkription	72
4.5	Arbeitsprotokoll –PCR	73
4.6	Bestimmung des Referenzgens	74
4.7	Auswertung	75
5	ELISA	76
5.1	Grundlage der Methode	76
5.2	Materialien für die ELISAs	76
5.3	Arbeitsprotokoll	77
5.4	Auswertung	79
6	Statistik	79
III.	Ergebnisse	80
1	Einflüsse einer VGX und VGX+VNS auf klinische und neurophysiologische Parameter während einer LPS induzierten systemischen Entzündung	80
1.1	Neurophysiologische Parameter	80
1.2	Klinische Parameter	81
2	Einflüsse einer VGX und einer VGX+VNS auf Faktoren des humoralen und zellulären Signalwegs während einer LPS induzierten systemischen Entzündung	85
2.1	Peripherie	85
2.1.1	Zytokine	85
2.2	Hypothalamus	87
2.2.1	Zytokine	87
2.2.2	Transkriptionsfaktoren	89

2.2.3	Zielgene	91
2.2.4	Lymphozyten und Mikroglia	92
2.2.5	Faktoren mit Bedeutung für die Adhäsion und Migration von Immunzellen	94
2.2.6	Neutrophile Granulozyten	97
2.3	Cortex.....	100
2.3.1	Zytokine.....	100
2.3.2	Transkriptionsfaktoren	103
2.3.3	Zielgene	105
2.3.4	T-Lymphozyten und Mikroglia	106
2.3.5	Faktoren mit Bedeutung für die Adhäsion und Migration von Immunzellen	108
2.3.6	Neutrophile Granulozyten	111
2.4	Leptin	116
IV.	Diskussion	117
1	Das Tiermodell und der Versuchsablauf.....	117
1.1	Das Tier- und Sepsismodell.....	117
1.2	Narkose mit Chloralose und Relaxation mit Pancuronium	118
1.3	Parameter zur Sicherstellung der Stabilität des Versuchsprotokolls	119
2	Auswirkungen einer VGX und VGX+VNS auf klinische und neurophysiologische Parameter während einer LPS bedingten Inflammation.....	120
2.1	Kreislauf und Metabolismus.....	120
2.2	Somatosensorisch evozierte Potenziale und die evozierte Flussantwort.....	121
3	Auswirkungen einer VGX und VGX+VNS auf Faktoren des humoralen Wegs während einer LPS bedingten systemischen Inflammation	124
3.1	Periphere Zytokine.....	124
3.2	Zytokine im Gehirn.....	128
3.3	Transkriptionsfaktoren.....	134
3.4	Zielgene	140
4	Auswirkungen einer VGX und VGX+VNS auf Faktoren des zellulären Wegs während einer LPS bedingten systemischen Inflammation	144
4.1	T-Lymphozyten	144

Inhaltsverzeichnis

4.2	Mikroglia	145
4.3	ICAM-1 und CXCL1	146
4.4	NG und Kolokalisation	150
4.5	Leptin	152
5	Fazit und Ausblick	155
V.	Zusammenfassung.....	161
VI.	Summary	163
VII.	Abkürzungsverzeichnis.....	165
VIII.	Literaturverzeichnis	169
IX.	Anhang	207
1	Eigene Publikationen	207
2	Danksagung.....	208
3	Eidesstattliche Erklärung	210

I. Einleitung

1 Bedeutung der Sepsis

1.1 Definition

Die erste Erwähnung der Sepsis geht auf Hippokrates um 400 v. Chr. zurück. Dabei ist das Wort Sepsis dem griechischen entlehnt und bedeutet soviel wie „Fäulnis“.

Eine modernere Definition beschreibt die Sepsis als *„Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“* [435].

Da dies einen weitläufigen Symptomkomplex umschreibt und in der Klinik häufig zu Problemen bei der Diagnostizierung von Patienten führt, wurden in einer Konsensuskonferenz der „Society of Critical Care Medicine“ und des „American College of Chest Physicians“ verschiedene Termini zur Klassifizierung des septischen Geschehens eingeführt [67].

Bei dem systemischen inflammatorischen Reaktionssyndrom („Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS)) handelt es sich um eine systemische Entzündungsreaktion, die durch unterschiedlichste Ätiologien hervorgerufen werden kann. Man spricht von einer SIRS wenn mindestens zwei der folgenden klinischen Parameter vorliegen:

- Hyperthermie oder Hypothermie
- Tachykardie
- Tachypnoe
- Leukozytose oder Leukopenie oder mehr als 10 % Stabkernige

Während eine Sepsis im Wesentlichen eine SIRS mit nachgewiesener Infektion ist, kommen bei einer schweren Sepsis noch eine Hypoperfusion, Organdysfunktion und Hypotension dazu. Das Hauptsymptom des septischen Schocks hingegen ist eine massive Hypotonie, die trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr bestehen bleibt.

Aus den oben beschriebenen Krankheitsstadien kann sich ein Multiorganversagen („Multi Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS)) entwickeln. Dabei handelt es sich um das progressive Versagen mehrerer lebenswichtiger Organe, das ohne Eingreifen nicht zu beheben ist [100].

1.2 Inzidenz

Eine Studie, die 2003 bis 2004 in Deutschland durchgeführt wurde, ergab, dass jährlich 116/100 000 Einwohnern an einer Sepsis und 110/100 000 Einwohnern an einer schweren Sepsis bzw. an einem septischem Schock erkranken [147, 390]. Dies ergibt eine Gesamtzahl von 154 000 Erkrankten pro Jahr in Deutschland. Dabei schwankt die 90-Tages-Sterblichkeit zwischen 20 % bei einer Sepsis und 54 % bei einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock. Auch wenn es von der Öffentlichkeit nicht entsprechen wahrgenommen wird, stellt die Sepsis damit die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar und liegt mit 162 Verstorbenen pro Tag dicht hinter dem akuten Herzinfarkt mit 175 Verstorbenen pro Tag [78, 147, 390]. Ein weiterer Aspekt ist die ökonomische Bedeutung der Sepsis. Laut Deutscher Sepsis Gesellschaft e. V. liegen die reinen Behandlungskosten der Patienten mit schwerer Sepsis bei 1,77 Milliarden Euro und die Ausfälle aufgrund von Produktivitätsverlust bei weiteren geschätzten 4,5 Milliarden Euro [390]. Damit stellt die Sepsis einen bedeutenden Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar.

Auch in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung sind die Verluste durch Jungtiererkrankungen, ungeachtet konstanter Weiterentwicklung des Aufzuchtmanagements und der medizinischen Versorgung, erheblich. Neben den enteralen und pulmonalen Erkrankungen ist die Sepsis dabei eine der häufigsten Verlustursachen in der Kälberaufzucht [138, 156, 354]. Dabei entstehen wirtschaftliche Verluste nicht nur durch den Verlust des Tieres selbst oder durch entstehende Medikamenten- und Behandlungskosten. Durch die systemische Entzündungsreaktion kommt es zu krankheitsbedingten Verhaltensänderungen wie beispielsweise einer Anorexie, die eine gestörte Entwicklung und Leistungsminderung der überlebenden Tiere bedingen kann. Ein eingeforderter kritischerer Umgang mit Antibiotika in der Tieraufzucht könnte die Probleme der Inflammation und Sepsis in der Veterinärmedizin in den nächsten Jahren noch verstärken.

1.3 Pathophysiologie der Sepsis und der LPS induzierten systemischen Inflammation

Das Immunsystem erkennt pathogene Mikroorganismen an zumeist hoch konservierten Motiven, welche Pathogen assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs)) genannt werden. PAMPs können Lipide, Lipoproteine, Proteine und Nukleinsäuren einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen sein [249, 512]. Ihre Erkennung erfolgt über „pattern recognition receptors“ des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise die Toll-like-Rezeptoren (TLR) [24].

Da gram-negative Bakterien und speziell *Escherichia coli* (*E. coli*) häufige Auslöser einer Sepsis darstellen, wurde zur Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion im vorliegenden Versuchsdesign das PAMP Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* (O111:B4, L2630) gewählt. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und setzt sich aus zwei Einheiten zusammen. Der Lipid A Teil dient der Verankerung in der äußeren Bakterienmembran und ist eine hoch konservierte Struktur, welche vom Organismus als PAMP erkannt wird und somit die primäre immunstimulierende Komponente darstellt. Des Weiteren besteht LPS aus dem Polysaccharid Teil, welcher wiederum aus der Kernregion und der O-spezifischen Kette besteht [151].

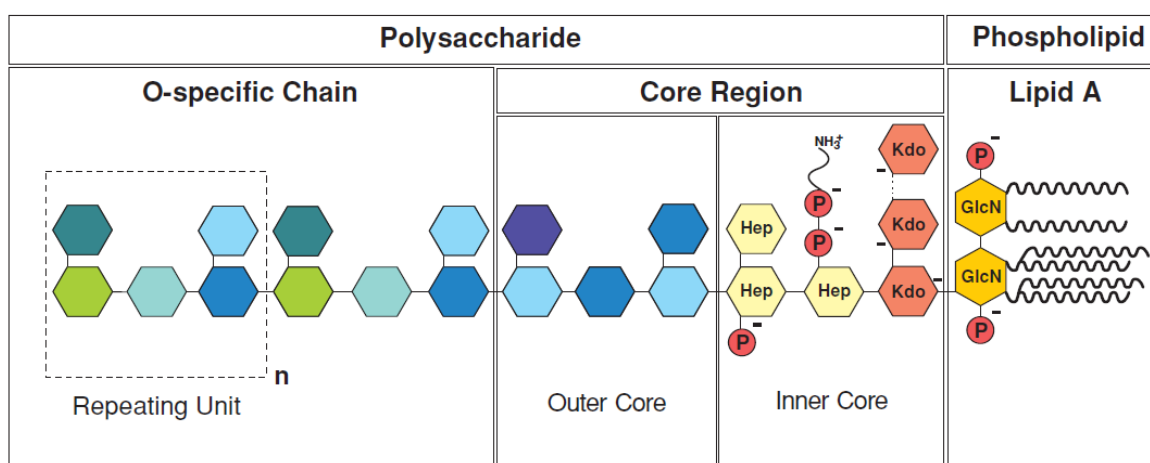


Abbildung 1: Struktur von LPS

LPS besteht aus dem Lipid A Teil, der Kernregion, welche sich in die innere und äußere Kernregion aufteilt und der hydrophilen O-spezifischen Kette, welche eine hohe strukturelle Variabilität aufweist. P = Phosphat, GlcN = Glucosamin, Kdo = 2-Keto-3-desoxyoctulosonic acid, Hep = D-glycero-D-manno-heptose. [13]

LPS führt zunächst zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems, über den Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) und das Glykoprotein „Cluster of Differentiation 14“ (CD14) [281, 385]. Diese Rezeptoren werden außerdem auch in bestimmten Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie beispielsweise den *Circumventrikulären Organen* (CVOs), dem *Plexus choroideus* und den *Meningen* exprimiert [94, 363, 387]. Daraufhin läuft eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade ab, die über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression von Genen der Immunantwort und der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, biologisch aktive Lipide, und reaktive Sauerstoffspezies führt [13]. Im Folgenden kommt es außerdem zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Diese Vorgänge stellen, solange sie ausbalanciert und kontrolliert ablaufen, eine physiologische Abwehrreaktion des Körpers dar, welche im Rahmen einer Immunantwort eindringende Pathogene eliminiert und die Homöostase wieder herstellt. Im Falle einer Sepsis kommt es jedoch zu einer exzessiven und unbalancierten Freisetzung zunächst proinflammatorischer Mediatoren, welche eine komplexe systemische Entzündungsreaktion bedingen. Dabei kommt es neben der Aktivierung der Akuten Phase Reaktion und des Komplementsystems [13, 166] auch zu einer Verschiebung des hämostatischen Gleichgewichts hin zu einem prokoagulatorischen Status, verbunden mit dem Risiko einer intravasalen disseminierten Gerinnung [291, 537].

Die im Rahmen der Sepsis auftretende Aktivierung des Endothels führt zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, welche die Adhäsion von Leukozyten und damit ihre Diapedese erleichtern [544]. Auch Mediatoren des Metabolismus wie beispielsweise Leptin, welches von Fettzellen gebildet wird, können durch LPS induziert werden und zur Migration von Immunzellen beitragen [417]. Außerdem kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, die zum einen zur Bildung von Ödemen und zum anderen einer gestörten Barrierefunktion führen kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Verlust des peripheren Gefäßtonus, durch eine Hyporeaktivität der Gefäße und einer Imbalance zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorisches Mediatoren. Eine besondere Rolle spielt dabei Stickstoffmonoxid (NO), welches während einer Entzündung durch die induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) exzessiv gebildet wird. Die dadurch entstehende

periphere Vasodilatation induziert eine Hypotonie, die über eine Hypoperfusion und Zellschädigung zum Organversagen führen und in einem septischen Schock gipfeln kann und als wesentlicher Faktor für die Sterblichkeit während des septischen Schocks angesehen wird [314].

Nach der initialen hyperinflammatorischen Phase folgt häufig eine hypoinflammatorische Phase, die auch als „compensatory anti-inflammatory response syndrome“ (CARS) oder Immunparalyse bezeichnet wird und mit einer zellulären Hyporesponsibilität und einer zellulärer Erschöpfung einhergeht. Vermittelt wird sie über eine Reihe anti-inflammatorische Mechanismen wie Zytokine (bspw. Interleukin (IL)-10), sowie lösliche Zytokinrezeptoren, regulatorische Immunzellen, die Apoptose von Leukozyten, epigenetische Regulation und neuroendokrine Mechanismen [69, 125].

Allerdings konzentriert sich die vorliegende Arbeit vor allem auf die frühe, überwiegend hyperinflammatorische Phase der Sepsis.

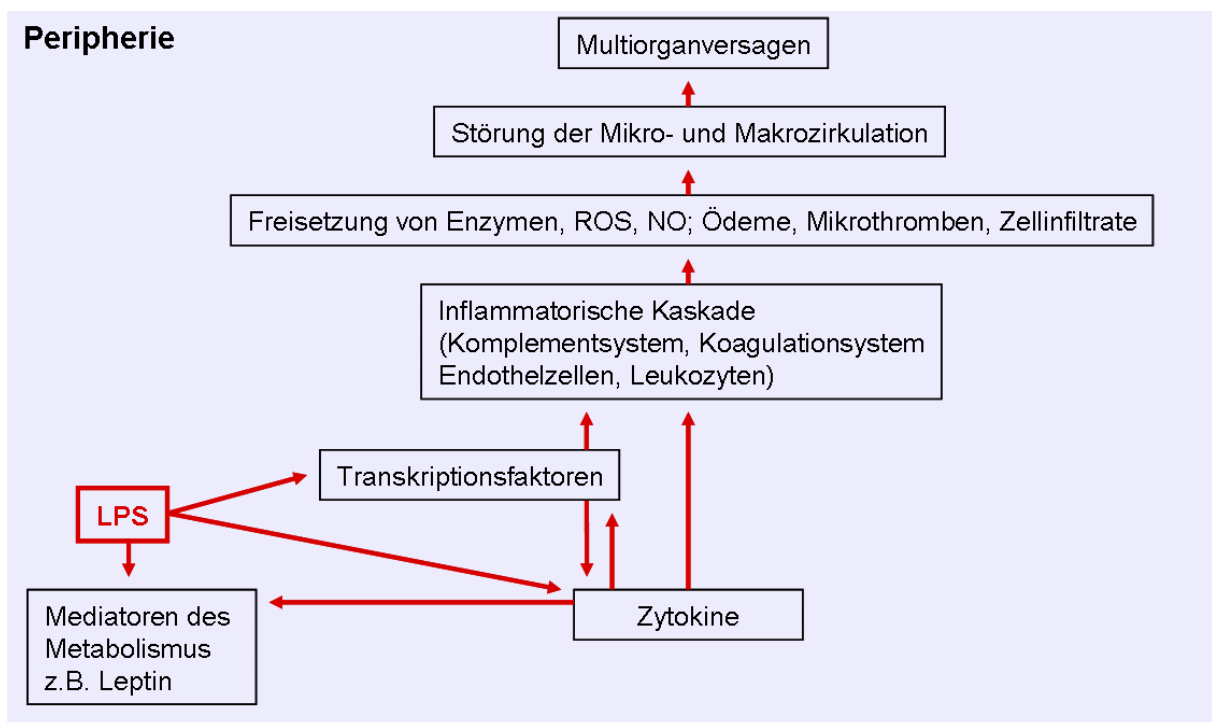


Abbildung 2: schematische Darstellung der pathophysiologischen Abläufe in der Peripherie nach LPS Stimulation.

LPS induziert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in der Peripherie. Dies führt zur Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade, die unter anderen mit einer Aktivierung von Leukozyten, dem Endothel, der Komplementkaskade und Koagulation einhergeht und zur Produktion und Freisetzung von Enzymen, ROS, NO, Mikrothromben, Ödemen und Zellinfiltraten führt und eine Störung der Mikro- und Makrozirkulation induziert, welche schließlich im Multiorganversagen gipfelt.

ROS = reactive oxygen species, NO = Stickstoffmonoxid, LPS = Lipopolysaccharid

2 Humoraler Weg der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn

Während einer systemischen Entzündung kommt es jedoch nicht nur zu einer Schädigung peripherer Organe, sondern auch des Gehirns. Dies ist von besonderer Bedeutung, da das Gehirn wie kein anderes Organsystem zu einer modulatorischen Beeinflussung des Immunsystems beitragen kann und somit auch ein mögliches Zielorgan für therapeutische Ansatzpunkte darstellt. Dabei interagieren die Peripherie und das ZNS über drei Wege: den humoralen Weg, den zellulären Weg und den neuronalen Weg [8, 381].

Die wichtigsten Botenstoffe des humoralen Wegs sind Zytokine. Zytokine sind wasserlösliche Proteine, Glykoproteine bzw. Polypeptide, die als endogene Mediatoren der Modulation und Regulation des Immunsystems, inflammatorischer Reaktionen, der Zellfunktion, Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, sowie der Regeneration dienen. Physiologischerweise sind Zytokinspiegel extrem niedrig, sie können jedoch nach infektiösen, inflammatorischen oder auch Stress-induzierten Stimuli innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden gebildet werden [102, 491, 495]. So kommt es während einer Sepsis zu einer sehr starken Induktion von Zytokinen, die auch als „cytokine-storm“ bezeichnet wird [87]. Zytokine werden überwiegend von Leukozyten, aber auch von Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen gebildet [438]. Im Gehirn sind Endothelzellen, Astrozyten (IL-1 β , IL-6), Mikroglia und Neurone (Tumornekrosefaktor (TNF) α , IL-1 β , IL-6) in der Lage Zytokine zu produzieren [17, 75, 101, 164, 187, 295, 438].

Zytokine können über unterschiedliche Wege mit dem Gehirn interagieren. Zum einen können Zytokine vagale oder andere sensorische Afferenzen stimulieren, welche diese Informationen über ein neuronales Signal ans Gehirn weiterleiten. Auf diesen Weg wird in Kapitel I 4.1 näher eingegangen. Andererseits können Zytokine Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (BBB), Gliazellen und perivaskuläre Makrophagen aktivieren und sie so zur Sekretion sekundärer Signalstoffe stimulieren [517]. Ein weiterer wichtiger Ort für die Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS sind die CVOs. Aufgrund der unvollständigen BBB in den CVOs können Zytokine dort Zellen direkt aktivieren und dadurch zu einer Signalweiterleitung führen (siehe Kapitel I 2.1.2)

[412]. Außerdem können Zytokine auch über sättigbare Transporter in der BBB ins ZNS gelangen. Dies konnte bisher für IL-1 β , IL-6 und TNF α gezeigt werden. Allerdings werden auf diese Weise nur sehr geringe Zytokinkonzentrationen im Gehirn erreicht, weshalb dieser Mechanismus vermutlich von geringer Bedeutung ist [34-35].

2.1.1 Die Blut-Hirn Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BBB) und die Blut-Liquor-Schranke ermöglichen die Aufrechterhaltung eines ZNS spezifischen extrazellulären Umfelds. Sie verhindern bzw. regulieren das Eindringen verschiedenster Stoffe. Zu diesen gehören sowohl exogene Stoffe und Mikroorganismen als auch endogene neuroaktive Substanzen (bspw. Ionen, Zytokine, Hormone, Aminosäuren u.a.) und Immunzellen [1].

Die BBB besteht aus den Endothelzellen der Gehirnkapillaren, an die sich Perizyten anlagern und der sie umschließenden Basalmembran. Darauf folgen zahlreiche unterstützende Astrozytenendfüßchen. Zwischen Astrozyten und Basalmembran befindet sich der perivaskuläre Raum, in dem Zellen, wie beispielsweise perivaskuläre Makrophagen vorhanden sein können [261].

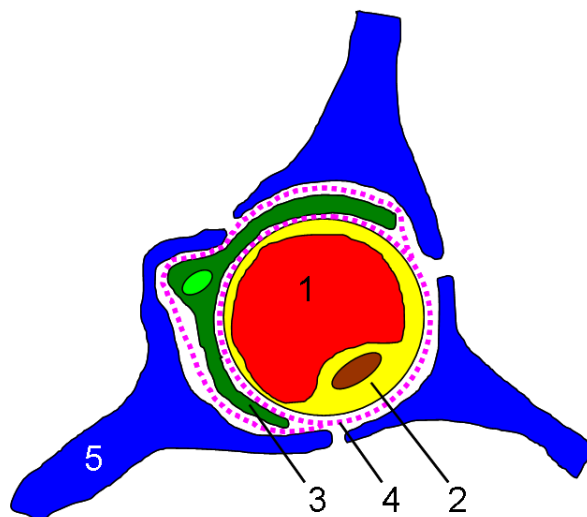


Abbildung 3: Schematische Übersicht über den Aufbau der Blut-Hirn-Schranke. Das Lumen der Gehirnkapillaren (1) wird durch Endothelzellen (2) begrenzt, an die sich Perizyten (3) anlagern. Zusammen werden sie von einer Basalmembran (4) umgeben, an die zahlreiche Astrozytenendfüßchen (5) angrenzen. Modifiziert nach [140]

Das Endothel der BBB ist nicht fenestriert und weist eine geringe Pinozytoserate auf, was die transzelluläre Passage von größeren und hydrophilen Molekülen verhindert

[157]. Kleine lipophile Moleküle und Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid können jedoch durch das Endothel diffundieren. Des Weiteren verhindern „tight junctions“ zwischen den Endothelzellen die parazelluläre Diffusion wasserlöslicher Moleküle [439]. Um jedoch einen funktionellen Stoffaustausch zu gewährleisten weist die BBB zahlreiche Transportmechanismen zum geregelten Stoffaustausch auf, welche den Influx von Nährstoffen und den Efflux von toxischen Stoffen und Metaboliten ermöglichen [42, 60, 305, 359]. Zytokine können aufgrund ihrer Polarität und Größe nicht durch die BBB diffundieren. Sie können jedoch in geringen Mengen über aktive und sättigbare Transportmechanismen die BBB überwinden [35-36, 191, 533]. Auch Immunzellen können über parazelluläre und transzelluläre Mechanismen die BBB überwinden. Ihr Übertritt ins ZNS wird unter physiologischen Bedingungen jedoch streng kontrolliert und limitiert [304, 540].

Im Zuge einer Inflammation kann es zu Veränderungen der Permeabilität der BBB kommen. Dabei werden die „tight junctions“ der Endothelzellen gelöst, die Perizyten ziehen sich zurück und die Basalmembran verliert ihre Integrität. Dadurch kommt es zum Verlust der Barrierefunktion und zur Störung der Homöostase, was schließlich zu einer Beeinträchtigung der Gehirnfunktion führt [1].

2.1.2 *Circumventrikuläre Organe (CVOs) und Plexus choroideus*

Neben den durch die BBB strikt abgetrennten Hirnbereichen gibt es auch solche, die eine weniger strenge Barriere besitzen. Dazu gehören die *circumventrikulären Organe* (CVOs), welche nahe der Ventrikel lokalisiert sind [207], und die *Plexus choroideus*.

Bei den CVOs handelt es sich um kleine neuronale Strukturen, die sehr stark vaskularisiert sind und fenestrierte Kapillaren besitzen. Dadurch können auch größere und polare Moleküle mit Neuronen in Kontakt treten. So wird über die CVOs eine Kommunikation zwischen peripheren Mediatoren und dem ZNS möglich.

Die CVOs werden in zwei Gruppen eingeteilt, die sekretorischen CVOs (*Eminentia mediana* (ME), *Glandula pinealis* (Epiphyse), *Organum subcommissurale* (SCO), *Neurohypophyse*) und die sensorischen CVOs (sCVOs) (*Organum subfornicale* (SFO), *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), *Area postrema* (AP) [453].

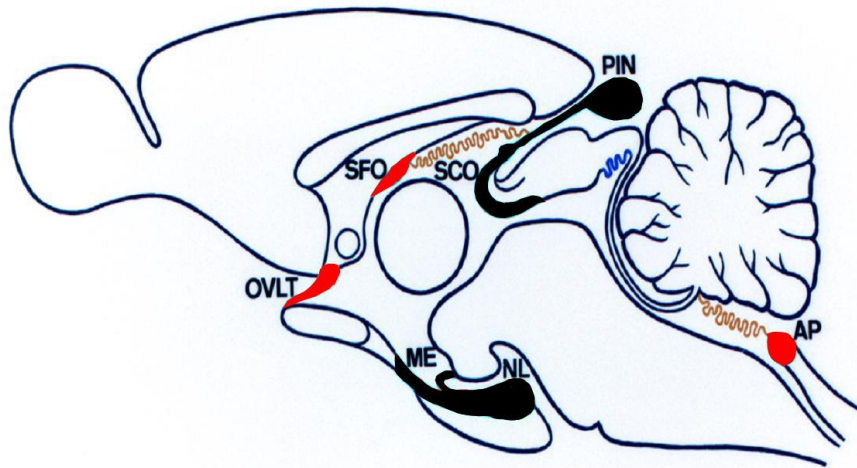


Abbildung 4: schematische Darstellung der Lage der circumventrikulären Organe

Die sensorischen CVOs sind in rot dargestellt: *Organum subfornicale* (SFO), *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und *Area postrema* (AP).

Die sekretorischen CVOs sind in schwarz dargestellt: *Eminentia mediana* (ME), *Glandula pinealis* (PIN) (*Epiphyse*), *Organum subcommissurale* (SCO) und *Neurohypophyse* (NL). Die *Plexus choroideus* sind in braun dargestellt. Modifiziert nach [413]

Die sCVOs besitzen eine Reihe von Rezeptoren und Ionenkanälen, über die sie Signale aus der Peripherie detektieren können. Sie sind maßgeblich an der Regulation des Wasser- und Salzhaushalts, des kardiovaskulären Systems und des Futter- und Energiehaushalts sowie der Detektion emetischer Substanzen beteiligt.

Der *Plexus choroideus* ist ein zottiges Kapillargeflecht, welches aus den Ventrikelwänden entspringt und bis in die Ventrikel hereinragt. Die Begrenzung des *Plexus choroideus* bildet eine Lage Epithelzellen mit zahlreichen Mikrovilli, welche auf einer Basalmembran lokalisiert sind. Benachbarte Zellen sind durch „tight junctions“ verbunden, die den Stoffaustausch zwischen Blut und Cerebrospinalflüssigkeit begrenzen und somit ein Teil der Blut-Liquor-Schranke darstellen. Unter den Choroideus Epithelzellen und der Basalmembran befindet sich ein dichtes Kapillarbett mit fenestriertem Endothel [145, 283]. Ursprünglich galt die Produktion der Cerebrospinalflüssigkeit als Hauptaufgabe des *Plexus choroideus*. In jüngerer Zeit wird jedoch immer mehr über seine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns bekannt [174].

Sowohl die CVOs, als auch die *Plexus choroideus* spielen eine bedeutende Rolle für die Immunreaktion des Gehirns [44]. Durch die unvollständige BBB kommen Zellen der CVOs und des *Plexus choroideus* mit Substanzen aus dem peripheren Blut in Kontakt. So können über spezifische Rezeptoren zum einen proinflammatorische

Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 und TNF α [383-384], und zum anderen auch PAMPs wie LPS detektiert werden. Diese Information kann entweder neuronal weitervermittelt werden [447] oder lokal zur Bildung proinflammatorischer Mediatoren führen [412, 510] und somit die Inflammation des ZNS weiter propagieren. Dabei sind beispielsweise das OVLT und die präoptische Region des Hypothalamus (*Nucleus praeopticus medianus*) an der Entstehung einer Fieberantwort beteiligt [56, 107]. Eine wichtige Schnittstelle zwischen dem Immunsystem und dem Nervensystem ist die *Area postrema*. Sie steht unter anderem mit dem *Nucleus tractus solitarius* (NTS) und den *Nucleus dorsalis nervi vagi* aber auch mit dem Hypothalamus in Verbindung [211, 241, 332, 520].

Des Weiteren werden Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise das „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) auf Plexusepithelzellen konstitutiv exprimiert und sowohl im *Plexus choroideus* als auch in den CVOs durch inflammatorische Stimuli induziert. Den CVOs und den *Plexus choroideus* wird somit auch eine wichtige Rolle als Eintrittspforte für Leukozyten zugeschrieben [148, 433, 471].

2.2 Transkriptionsfaktoren

Inflammatorische Mediatoren können zur genomischen Aktivierung von Zellen führen. Dafür erfolgt zunächst die Bindung dieser Mediatoren an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Daraufhin erfolgt im Rahmen einer Signalkaskade die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren und ihre Translokation in den Zellkern. Dort regulieren sie durch die Interaktion mit regulatorischen DNA Elementen die Transkription verschiedener Zielgene [343].

Im Folgenden soll auf die für die vorliegende Arbeit wichtigen Transkriptionsfaktoren näher eingegangen werden.

2.2.1 NF κ B und I κ B α

NF κ B („nuclear factor kappa B“) liegt im Zytoplasma ruhender Zellen zumeist als Heterodimer aus den Molekülen p50 und p65 vor. Allerdings verhindert eine Komplexbildung mit dem „Inhibitor of κ B“ (I κ B) die Translokation von NF κ B in den Zellkern und die dadurch vermittelte genomische Aktivierung der Zelle [29, 299]. Eine Vielzahl von Stimuli unter anderem auch LPS und Zytokine können zu einer

Aktivierung von NF κ B führen [104]. Nach Bindung ihres Rezeptors und Aktivierung der jeweiligen Signalkaskade erfolgt eine Phosphorylierung und Ubiquitierung von I κ B, gefolgt von dessen Abspaltung und Abbau im Proteasom. Daraufhin können die NF κ B-Dimere in den Nukleus translozieren und dort durch die Bindung an regulatorische Elemente („ κ B enhancer elements“) eine Vielzahl von Zielgenen regulieren [131, 452]. Zu diesen gehören auch Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und viele weitere inflammatorische Mediatoren [365, 394]. Somit ist NF κ B ein sehr wichtiger Faktor für nahezu alle Facetten der Immunantwort.

Die Regulation von NF κ B erfolgt überwiegend über I κ B. Dabei wird I κ B α sowohl durch inflammatorische Mediatoren, als auch durch NF κ B selber induziert [278, 287]. Glukokortikoide können ebenfalls die Bildung von I κ B induzieren [382], und IL-10 zu einem verminderten Abbau von I κ B führen und somit zur Hemmung von NF κ B beitragen [12]. Der „nuclear factor IL-6“ (NF-IL6) hingegen reduziert die I κ B Expression, sodass hier eine gegenseitige Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren vorliegt [88].

Durch die Regulation einer Vielzahl inflammatorischer Gene ist NF κ B auch für die Entstehung einer Sepsis von großer Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die NF κ B Aktivität in Sepsispatienten erhöht ist und mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Prognose korreliert [25, 64]. Sowohl in LPS als auch in „cecal ligation and puncture“ (CLP) Modellen konnte gezeigt werden, dass in Ratten die Hemmung des I κ B Abbaus zu einer reduzierten Expression von ICAM-1, CXCL-1 und Zytokinen, einer reduzierten Myeloperoxidaseaktivität in Geweben, einer reduzierten Endothelpermeabilität, einer Stabilisierung des Blutdrucks und einer Reduktion von Lungenschäden führte [300, 445]. Ähnliche Ergebnisse konnten verschiedene Arbeitsgruppen auch nach Hemmung der NF κ B Aktivität in Mäusen erzielen [16, 225, 361].

2.2.2 STAT3 und SOCS3

Der „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) wird durch Zytokine (IL-6, IL-10, Interferon- γ) [160, 258], LPS [264] und andere Faktoren aktiviert. Der Janus-Kinase/STAT (JAK/STAT) Signalweg ist insbesondere wichtig für die gp130 vermittelte Signaltransduktion der IL-6 Familie [566]. Dabei erfolgt eine

Phosphorylierung durch rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen (Janus-Kinase 2 (JAK2)), gefolgt von der Bildung von Homo- oder Heterodimeren und anschließend der Translokation in den Zellkern [200, 256]. Dort kann STAT3 die Expression einer Vielzahl von Zielgenen regulieren. Dazu gehören vor allem auch Gene, welche mit Inflammation assoziiert sind, wie verschiedene Zytokine, die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) [419] und Akute Phase Proteine, einige Transkriptionsfaktoren und Faktoren für Zellwachstum, -differenzierung, Angiogenese und Apoptose [92, 127]. Die negative Regulation von STAT3 erfolgt unter anderem über die Hemmung der JAK durch den „suppressor of cytokine signalling 3“ (SOCS3). SOCS3 wird im Sinne einer negativen Rückkopplung durch STAT3 induziert aber auch durch einige Zytokine und LPS [61, 65, 273, 470]. Auch eine Induktion von SOCS3 durch NF-IL6 wurde beschrieben [551].

Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von STAT3 zu einer Verminderung von Organschäden und einer erhöhten Überlebensrate von Ratten in CLP Modellen führte [219, 559]. Auch die Überexprimierung von SOCS3 in genetisch veränderten Mäusen zeigte einen protektiven Effekt nach Induktion eines septischen Schocks durch LPS und D-GalN [154].

2.2.3 NF-IL6

NF-IL6 gehört zur Gruppe der „CCAAT/enhancer-binding-proteins“ (C/EBP) und wird in der Literatur auch als C/EBP β bezeichnet [11]. Eine Aktivierung von NF-IL6 kann durch inflammatorische Zytokine, LPS [11, 89, 492], Hypoxie [199] aber auch durch neuronale Aktivität [480] erfolgen. Dabei wird die aktivierende Domäne freigegeben und die Translokation von NF-IL6 in den Zellkern, sowie dessen Bindung an DNA Regionen ermöglicht. Dabei kann NF-IL6 auch durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Modulation der Genexpression beitragen. So beeinflusst NF-IL6 durch die Induktion von SOCS3 [551] und die Hemmung von I κ B α [88] beispielsweise auch die Aktivität von STAT3 und NF κ B.

NF-IL6 wird in einer Vielzahl von Geweben wie der Leber, Magen-Darm-Trakt, Lunge, Fettgewebe, Gehirn, Milz, Niere, Mamma, Plazenta und in Leukozyten exprimiert [321]. Im Gehirn sind Neurone [473], Astrozyten, Mikroglia [144], Endothelzellen und perivaskuläre Makrophagen wichtige NF-IL6 exprimierende

Zelltypen [113]. NF-IL6 ist wichtig für die Zellproliferation und -differenzierung, den Glukose- und Fettstoffwechsel, die Thermogenese, das Langzeitgedächtnis, die Tumorgenese, das Immunsystem und die Inflammation [91, 386, 490, 570]. Wichtige inflammatorische Zielgene von NF-IL6 sind beispielsweise Zytokine [11, 376, 561], Enzyme (iNOS, mPGES) [136, 474], Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) [93] und Chemokine [562]. Somit scheint NF-IL6 unter anderem auch für die Auswanderung von Immunzellen von Bedeutung zu sein. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass NF-IL6-defiziente Mäuse eine verringerte Einwanderung neutrophiler Granulozyten (NG) ins Gehirn nach zerebraler Ischämie zeigen [245]. Zu einer therapeutischen Modulation von NF-IL6 im Rahmen einer Sepsis liegen bislang kaum Daten vor. Es wird jedoch eine Beteiligung von NF-IL6 an unterschiedlichen Erkrankungen wie Alzheimer, Schlaganfall und amyotropher Lateralsklerose vermutet [245, 476, 509]. Allerdings konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob NF-IL6 protektive oder negative Effekte im Gehirn vermittelt. So konnten Kapadia et al. (2006) zeigen, dass NF-IL6-defiziente Mäuse nach zerebraler Ischämie einen geringeren neuronalen Schaden, verbunden mit einer verminderten Inflammation im Gegensatz zu Wildtypmäusen aufweisen [245]. Andererseits konnte aber auch nachgewiesen werden, dass eine gesteigerte NF-IL6 Expression eine Hypoxie induzierte Apoptose in Neuronen vermindert [192] und wichtig für die neuronale Regeneration ist [340].

3 Zellulärer Weg der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn

3.1 Rekrutierung von Immunzellen

3.1.1 Diapedese

Um eine zelluläre Immunantwort in betroffenen Geweben ausführen zu können müssen Leukozyten zunächst einmal das Blutgefäßsystem verlassen und dabei die endotheliale Barriere überwinden. Dafür werden Endothelzellen und Leukozyten einerseits direkt über „danger associated molecular patterns“ (DAMPs) und PAMPs aktiviert, andererseits kommt es zu einer weiteren Aktivierung durch von Immunzellen

gebildete proinflammatorische Zytokine. Dies führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen [469]. Im Zuge der Diapedese kommt es zunächst zu einer schwachen Bindung, welche überwiegend durch Selektine (bspw. E-/P-/L-Selektin) und ihre Liganden (bspw. „E-selectin ligand 1“ (ESL-1), „P-selectin glycoprotein ligand 1“ (PSGL-1), „sialyl-Lewis x antigen“ (S-Le^x)) vermittelt wird. Dadurch werden die Leukozyten gebremst und rollen auf dem Endothel entlang. Die Aktivierung von Chemokinrezeptoren führt dabei zu einer erhöhten Adhesivität von Integrinen auf Leukozyten. Dies ermöglicht den Arrest der Immunzellen durch die Bindung von Integrinen (bspw. „Lymphocyte function-associated antigen 1“ (LFA-1), „macrophage-1 antigen“ (Mac-1), „very late antigen 4“ (VLA-4)) an Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie (bspw. „intercellular adhesion molecule-1/-2“ (ICAM-1, ICAM-2), „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1)) [186, 284, 334, 355, 466]. Danach erfolgt die parazelluläre oder transzelluläre Migration durch das Endothel.

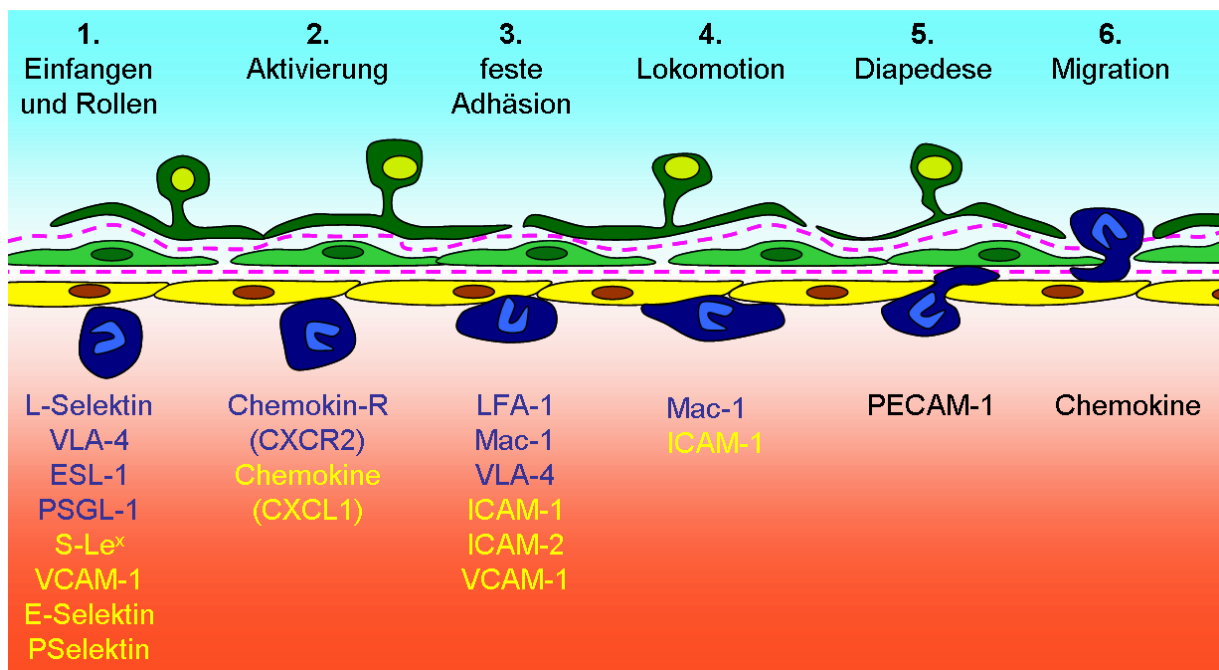


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Leukozytendiapedese. Der obere Abschnitt zeigt die einzelnen Schritte der Diapedese, während der untere Abschnitt ausgewählte dabei benötigte Adhäsionsmoleküle zeigt. Adhäsionsmoleküle, welche auf Endothelzellen exprimiert werden, sind in gelb dargestellt, solche, die auf Leukozyten exprimiert werden in blau. Das abluminale Gewebe ist hellblau, die Basalmembran pink, Perizyten grün, Astrozyten dunkelgrün, Endothelzellen gelb, Leukozyten dunkelblau und das Gefäßlumen rot dargestellt. VLA-4 = very late antigen 4, ESL-1 = E-selectin ligand 1, PSGL-1 = P-selectin glycoprotein ligand 1, S-Le^x = sialyl-Lewis x antigen, VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1, LFA-1 = lymphocyte function-associated antigen 1, Mac-1 = macrophage-1 antigen, ICAM = „intercellular adhesion molecule“, PECAM-1 = platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. Modifiziert nach [334, 355, 523].

3.1.2 Leptin

Leptin ist klassischerweise als Sättigungshormon bekannt. Es wird überwiegend in Adipozyten gebildet und reguliert über hypothalamische Rezeptoren den Energiehaushalt und die Futteraufnahme [168]. Jüngst wird jedoch immer mehr über die Einflüsse von Leptin auf die Immunantwort bekannt. So bewirkte eine genetische Leptindefizienz (ob/ob Mäuse) oder Leptinresistenz (db/db Mäuse) in Mäusen eine Immunsuppression, eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen [224, 307] und eine Resistenz gegenüber Autoimmunreaktionen [83, 313, 417]. Leptin wird unter anderem als Reaktion auf inflammatorische Stimuli wie LPS vermehrt gebildet [153, 189, 429] und funktionelle Leptinrezeptoren konnten neben Regionen des Hypothalamus auch auf einigen CVOs, den Meningen, Ependymzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden [339, 418]. Die Leptinwirkung kann experimentell durch Fasten, ein Leptinantiserum oder in genetisch veränderten Mäusen durch eine Störung der Leptinproduktion (ob/ob Mäuse) oder des Leptinrezeptors (db/db Mäuse) aufgehoben werden. In all diesen Fällen beobachtet man eine Verminderung der LPS induzierten Einwanderung NG ins Gehirn, sowie eine reduzierte Expression von CXCL1, CXCL2, IL-1 β und ICAM-1 im Gehirn [8, 417]. Somit ist Leptin ein weiterer wichtiger Faktor, für die Rekrutierung von Immunzellen ins Gehirn. Des Weiteren ist Leptin an der Entstehung von „sickness behaviour“ und einer krankheitsbedingten Anorexie beteiligt [196, 423].

3.2 Immunzellen des Gehirns

Das ZNS ist aufgrund funktioneller (überwiegend postmitotische Zellen) und anatomischer (starre Begrenzung lässt keinen Raum für Schwellungen) Begebenheiten empfindlich gegenüber ausgeprägten entzündlichen Reaktionen. Trotzdem muss ein ausreichender immunologischer Schutz dieses Organs sichergestellt werden, ohne es dabei zu schädigen. Deshalb weist das ZNS auch auf zellulärer Ebene einige immunologische Besonderheiten auf. Zum einen wird der Eintritt von Leukozyten ins Gehirn streng limitiert, zum anderen weist das ZNS eine ihm eigene organspezifische Zusammensetzung der Immunzellpopulationen auf.

Unter physiologischen Bedingungen finden sich die folgenden Zelltypen im ZNS:

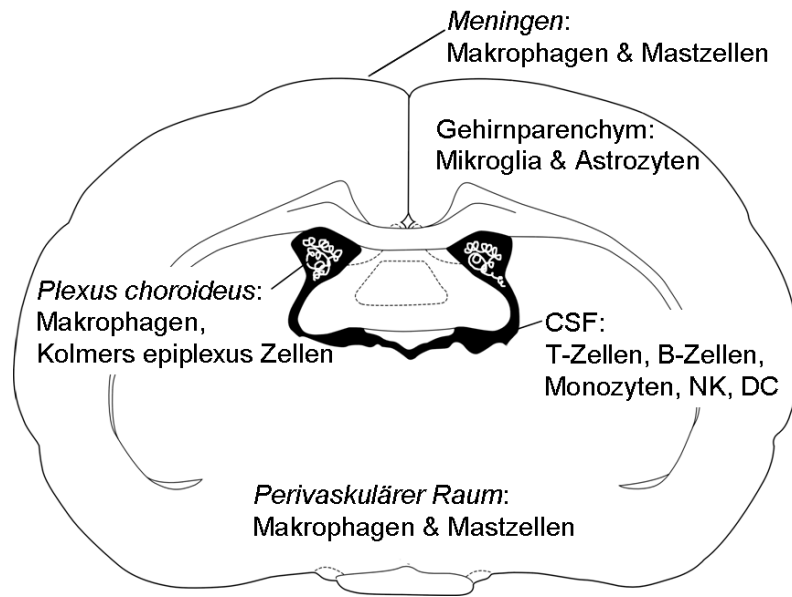


Abbildung 6: Vorkommen von Immunzellen unter physiologischen Bedingungen im Gehirn.

Gehirnparenchym: Mikroglia, Astrozyten [389], *Plexus choroideus*: Makrophagen, Kolmers epiplexus Zellen [184], CSF: T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK, DC [204], Meningen und Perivaskulärer Raum: Makrophagen und Mastzellen [251]. CSF = Cerebrospinalflüssigkeit, NK = natürliche Killerzellen, DC = dendritische Zellen

3.2.1 Mikroglia

Unter physiologischen Bedingungen zeigen Mikroglia einen verästelten Phänotyp mit zahlreichen Fortsätzen, welche sich durch das Parenchym bewegen. Früher bezeichnete man sie als inaktive Mikroglia, heute weiss man jedoch, dass sie mit ihren Fortsätzen das Parenchym aktiv überwachen [45, 352]. Intakte Neurone fördern über verschiedene Moleküle den „inaktiven“ überwachenden Status der Mikroglia, während eine Vielzahl von Signalen zu ihrer Aktivierung führt. Hierzu gehören exogene und endogene Warnsignale, sowie Komplementfaktoren und inflammatorische Zytokine [31]. Aktivierte Mikroglia nehmen eine amöboide Form an und sind zur Phagozytose, Lokomotion und teilweise auch Antigenpräsentation befähigt. Man unterscheidet, ähnlich wie bei Makrophagen, aktivierte Mikroglia vom Typ M1 und M2. Zellen vom Typ M1 setzen überwiegend proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF α), Chemokine sowie zytotoxische Substanzen (ROS, NO) frei. Dadurch verstärken sie die inflammatorische Reaktion und können zur Gewebeschädigung beitragen. Mikroglia vom Typ M2 hingegen sezernieren unter anderem anti-inflammatorische Zytokine (IL-10) und Wachstumsfaktoren (transforming growth factor (TGF)) und übernehmen somit überwiegend immunregulatorische Funktionen und fördern die Regeneration [45].

Nach LPS Applikation kann bereits nach wenigen Stunden eine Aktivierung von Mikroglia im Gehirn nachgewiesen werden [209]. Diese mikrogliale Aktivierung wird häufig mit der Entstehung eines Sepsis assoziierten Deliriums (SAD) in Verbindung gebracht [7, 463]. So beobachteten Anderson et al. (2015) einen Monat nach LPS Applikation in Mäusen eine Verstärkung von ängstlichem und depressionsartigem Verhalten, das unter anderem mit einer lang anhaltenden Aktivierung von Mikroglia einherging [22]. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht eindeutig bekannt.

Neben Mikroglia, welche als wichtigste residente Immunzellpopulation des Gehirns angesehen werden, können auch Astrozyten an der Immunantwort beteiligt sein. Zum einen sind sie in der Lage Zytokine [388] und Chemokine zu sezernieren [320, 513], zum anderen trägt der Verlust ihrer physiologischen Funktion zu einer Schädigung von Neuronen bei [53].

3.2.2 Monozyten / Makrophagen und Mastzellen

Makrophagen entstammen dem Knochenmark und finden sich unter physiologischen Bedingungen in den Meningen, dem *Plexus choroideus* und dem perivaskulären Raum [184]. Somit befinden sie sich an der Grenzfläche zwischen dem Blutgefäßsystem und dem ZNS Parenchym. Sie dienen der immunologischen Überwachung des ZNS, sowie der Phagozytose und Antigenpräsentation. Je nach Aktivierungsstatus wird ihnen entweder eine schädigende oder sogar eine protektive Beteiligung an zahlreichen neuroinflammatorischen Pathologien wie Multipler Sklerose (MS), ischämischer und traumatischer Hirnschädigung sowie der Alzheimer Erkrankung zugewiesen [62, 252, 263, 448].

Makrophagen und Mastzellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

3.2.3 Lymphozyten

Die Rolle von Lymphozyten während einer Sepsis wurde bislang überwiegend in der späteren hypoinflammatorischen Phase der Sepsis untersucht. Dabei ist die Apoptose von Lymphozyten an der Entstehung einer Immunsuppression beteiligt, welche mit einer erhöhten Sterblichkeit einhergeht [213, 536]. Venet et al. (2009) konnten zeigen, dass regulatorische T-Lymphozyten zu einer reduzierten Antwort von Lymphozyten

auf mitogene Stimuli in Mäusen und Sepsispatienten führten [516]. Somit scheinen unter anderem regulatorische T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Fehlregulation der Immunantwort einzunehmen [202, 437].

Für die frühe Phase der Sepsis zeigten Mihaylova et al. (2014) eine Reduktion nahezu aller T-Lymphozytenpopulationen im Blut 4,5 Stunden nach Sepsisinduktion. Dies galt jedoch nicht für natürliche Killerzellen, die nur nach zusätzlicher Vagotomie reduziert waren, und aktivierte T-Helferzellen, welche keinen Veränderungen unterlagen. Dahingegen zeigte sich eine erhöhte Anzahl aktivierter cytotoxischer T-Lymphozyten, die durch eine Vagotomie vermindert, durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation jedoch erhöht wurde [326]. In der Milz bewirkte LPS in der vagotomierten Gruppe eine Reduktion sämtlicher Lymphozyten, während LPS alleine oder eine zusätzliche Vagusnervstimulation (VNS) nur zu einer Reduktion neutrophiler Granulozyten führte. Auf die Bedeutung des *N. vagus* in diesem Zusammenhang wird in Kapitel I 4 näher eingegangen. Das Aktivierungsmuster war hierbei nicht beeinflusst [326]. Der Verlust von Lymphozyten in der vagotomierten LPS Gruppe spiegelte sich weder in einem Anstieg der Lymphozytenzahl im Blut wieder, noch ist er durch eine erhöhte Apoptoserate zu erklären, da die Apoptose erst nach etwa 12 bis 16 Stunden zu Veränderungen der Zellzahlen führt [536, 558]. Demnach scheint es naheliegend, dass es zu einer Marginalisation von Lymphozyten in peripheren Stromgebieten kommen könnte. Inwiefern dies zutrifft und welche Bedeutung es in der Pathogenese der Sepsis einnimmt muss jedoch noch näher untersucht werden. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit unter anderem eine mögliche Migration von Lymphozyten ins Gehirn in den ersten 4,5 Stunden der Sepsis untersucht werden.

Im Gehirn kommen Lymphozyten physiologischer Weise in der Cerebrospinalflüssigkeit vor, wobei es sich überwiegend um CD4+ Gedächtniszellen handelt [389, 483]. Es wird angenommen, dass sie größtenteils über den *Plexus choroideus* in die Cerebrospinalflüssigkeit gelangen und diese immunologisch überwachen [260]. Des Weiteren scheinen sie bei Lernprozessen, der Gedächtnisfunktion und der Plastizität des Gehirns eine Rolle zu spielen [40]. So konnten kognitive Defizite und abnormale Verhaltensweisen nach einer Depletion reifer T-Lymphozyten in Mäusen beobachtet werden [255]. T-Lymphozyten besitzen

jedoch auch schädigendes Potenzial und sind bei der Entstehung von ZNS-Pathologien wie MS und ischämischen Läsionen beteiligt [19, 289]. Welche Rolle T-Lymphozyten möglicherweise in der frühen Phase der Sepsis im Gehirn spielen ist unbekannt.

3.2.4 Neutrophile Granulozyten

Einerseits sind NG wichtig für die Eliminierung von Bakterien und somit die Kontrolle von Infektionen, andererseits sind sie an der Entstehung von Organschäden während einer Sepsis beteiligt. Dabei kommt es häufig zu Lungenschäden („acute respiratory distress syndrome“), die durch eine massive Infiltration von NG in die Lunge gekennzeichnet sind und durch die Depletion der NG verbessert werden können [2, 243, 530]. Des Weiteren können NG auch eine Rolle bei der inflammatorischen Schädigung von Niere [201], Leber [205] und Darm spielen [277]. Dennoch lieferte eine therapeutische Modulation der NG kontroverse Resultate. So konnten Perl et al. (2007) zeigen, dass die Hemmung der Apoptose NG in einem Sepsismodell mit lebenden Infektionserregern (CLP-Modell) zu einem Überlebensvorteil führte, während diese Hemmung in einem LPS induziertem Sepsismodell die Überlebensrate verringerte [59, 303, 373, 521].

Im Gehirnparenchym sind physiologischerweise keine NG enthalten. LPS sowie andere inflammatorische Stimuli führen jedoch innerhalb von 8 bis 24 Stunden zu einer Rekrutierung von NG ins Gehirn [8, 63, 235-236, 417, 567]. Dort produzieren sie inflammatorische Mediatoren (bspw. NO, IL-1 β , TNF α , CXCL1, CCL2) [8, 236, 348], welche zur Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen, sowie der Aktivierung des Endothels beitragen. Außerdem weisen NG ein hohes neurotoxisches Potenzial auf. So konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass NG über die Freisetzung von Proteasen (Myeloperoxidase (MPO), Matrixmetalloproteinasen), reaktiven Sauerstoffspezies und extrazellulärer decondensierter DNA, welche eigentlich der Bekämpfung von Infektionserregern dienen, neurotoxisch wirken [14, 132, 235, 348, 422]. Zusätzlich kann es zu einer erhöhten Permeabilität von Endothelien, verbunden mit der Entstehung eines Ödems und einer dadurch verschlechterten Gewebeoxygenierung, sowie einer Störung der BBB führen [63, 422]. Des Weiteren weisen aktivierte NG eine erhöhte Bindungsaffinität zu Endothelien und eine erhöhte Rigidität verbunden mit einer verminderten Verformbarkeit auf [76, 268,

455]. Dies kann eine vermehrte Adhäsion, Aggregation oder Sequestration der NG in der Mikrozirkulation bedingen und so zu einer Störung des Blutflusses gefolgt von ischämischen Gewebeschäden führen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NG nach peripherer LPS Gabe an der Entstehung von depressionsartigem Verhalten und einem gestörten Sozialverhalten bei Mäusen beteiligt sind und somit eine Rolle für die Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn spielen [8]. Durch diese Mechanismen könnten auch NG an der Entstehung des SAD beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb unter anderem untersucht werden, ob eine efferente Vagusnervstimulation die Migration NG ins Gehirn beeinflusst.

4 Neuronaler Weg der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn

4.1 Vagale Afferenzen

Eine wichtige Komponente des neuronalen Weges ist der *Nervus* (N.) *vagus*. Er entspringt als X. Gehirnnerv dem Hirnstamm und verzweigt sich anschließend im Brust- und Bauchraum. Efferente Anteile des *N. vagus* steuern über die parasympathische Innervation nahezu aller thorakalen und abdominalen Organe eine Vielzahl physiologischer Vorgänge [421]. In der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn weisen sie eine immunmodulierende Wirkung auf, welche unter dem Begriff cholinerg anti-inflammatorischer Weg bekannt ist und im folgenden Kapitel I 4.2 näher erläutert wird. Afferente Anteile hingegen repräsentieren den umgekehrten Weg und übermitteln Informationen aus der Peripherie an das ZNS [421]. Dabei ist der *N. vagus* auch an der Entstehung einer Reihe an zentralen inflammatorischen Reaktionen wie beispielsweise krankheitsbedingten Verhaltensänderungen und Fieber beteiligt. Dafür spricht, dass eine i.v. Applikation von IL-1 β die Frequenz von Aktionspotentialen in vagalen hepatischen Afferenzen erhöhte [351] und eine i.v. oder i.p. Injektion von LPS zu einer verstärkten c-Fos Expression als Marker einer erhöhten vagalen Aktivierung in primären afferenten Neuronen des *N. vagus* führte [172]. Des Weiteren ergaben Untersuchungen mit einem biotinylierten Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra), dass höchstwahrscheinlich IL-1 Bindungsstellen auf Glomuszellen vagaler Paraganglien vorhanden sind [180].

Als Teil des Kommunikationswegs zwischen Peripherie und Gehirn trägt der *N. vagus* außerdem auch zur Induktion inflammatorischer Mediatoren im Gehirn bei [55]. Dabei kommt es nach einer Aktivierung vagaler Afferenzen, zur Signaltransduktion in Kernregionen des Hirnstamms (bspw. Nucleus tractus solitarius), von wo das Signal über sekundäre Projektionen unter anderen in den Hypothalamus weitergeleitet wird [430]. Dort kann entweder direkt oder über die Bildung von sekundären Mediatoren eine „sickness response“ ausgelöst werden [55, 115]. So zeigten Layé et al. (1995) und Hansen et al. (1998), dass eine subdiaphragmatische Vagotomie einen LPS oder IL-1 β bedingten Anstieg der IL-1 β Expression im Hippocampus und Hypothalamus verminderte, wobei dieser Effekt unabhängig von der peripheren IL-1 β Expression war [195, 285]. Eine funktionelle Relevanz dieser Ergebnisse konnte untermauert werden, indem gezeigt wurde, dass eine subdiaphragmatische Vagotomie zu einem reduzierten „sickness behaviour“ [57-58], einer reduzierten Hyperalgesie [534], einer reduzierten Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse [171] und einer verminderten febrilen Antwort nach i.p. oder i.v. Applikation von LPS oder Zytokinen führte [181, 194, 398, 408, 411, 532, 535]. Allerdings zeigten einige Versuche auch, dass beispielsweise die Unterdrückung des Fiebers zum einen vom Applikationsort [181] und zum anderen von der Dosis des Pyrogens abhängig ist und nur bei niedrigen LPS Dosen auftritt [193, 398]. Dies weist darauf hin, dass der afferente vagale Weg bei höheren Dosen durch andere Mechanismen beispielsweise des humoralen Wegs überlagert wird [398].

4.2 Der cholinerge anti-inflammatorische Weg

Die Idee des cholinergen anti-inflammatorischen Wegs wurde 2000 von Borovikova et al. eingeführt und beschreibt einen Mechanismus zur Modulation der Immunantwort über den *N. vagus* [70-71]. Das Konzept des cholinergen anti-inflammatorischen Wegs wurde häufig kontrovers diskutiert und über die Jahre weiterentwickelt. Im Folgenden soll der aktuelle Wissenstand dargestellt werden, welcher gewiss auch in Zukunft durch neue Erkenntnisse weiter verfeinert werden wird.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass zur Vermittlung des cholinergen anti-inflammatorischen Wegs die folgenden anatomischen Strukturen und Mediatoren benötigt werden: der *N. vagus* [70-71], die Milz [221], T-Lymphozyten [402], nicht

neuronales Acetylcholin (ACh) [402], nikotinerge Acetylcholinrezeptoren ($\alpha 7$ nAChR) [527] [519], der *N. splenicus* [401], Noradrenalin und Makrophagen.

Allerdings ist bis heute noch nicht vollständig geklärt wie die Information vom *N. vagus* auf die Milz übermittelt wird. Eine direkte Innervation der Milz durch den *N. vagus* ist dabei aufgrund der anatomischen Gegebenheiten ausgeschlossen [43, 342]. Deshalb wurde zunächst ein disynaptischer Weg vermutet, wobei die Informationen des *N. vagus* im *Ganglion coeliacum* auf sympathische Fasern des *N. splenicus* umgeschaltet werden und über diesen die Milz erreichen [362, 401]. Allerdings konnten neuere Studien belegen, dass eine solche disynaptische Verschaltung nicht existiert [74, 84]. Deshalb postulierte Martelli et al. (2014), dass der *N. vagus* T-Lymphozyten in sekundär lymphatischem Gewebe des Magendarmtraktes mobilisiert. Ein Teil dieser T-Lymphozyten, welcher zur Synthese von ACh befähigt ist, wird in der Milz sequestriert [397] und bildet dort ACh. Dieses ACh bewirkt nun über $\alpha 7$ nAChR auf sympathische Nervenendigungen des *N. splenicus* eine Freisetzung von Noradrenalin. In diesem Fall ist die Noradrenalin Freisetzung also nicht über Aktionspotentiale vermittelt, sondern über die Aktivierung durch ACh. Das freigesetzte Noradrenalin wirkt seinerseits über β -adrenerge Rezeptoren auf Makrophagen, wodurch die Produktion proinflammatorischer Mediatoren gehemmt wird [310]. Doch auch dieser Weg ist noch nicht vollständig bewiesen und bleibt Gegenstand der Diskussion.

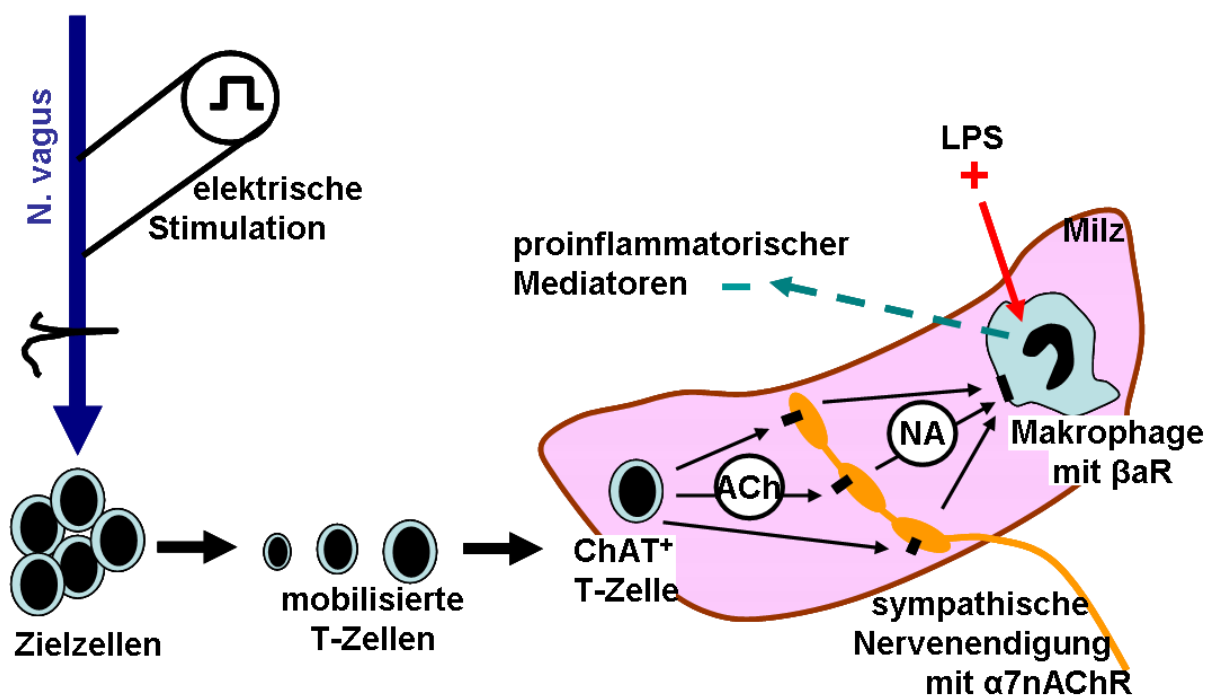


Abbildung 7: vereinfachte schematische Darstellung einer Hypothese des cholinergen anti-inflammatorischen Weges.

ChAT⁺ T-Zellen = Cholin Acetyltransferase positive T-Zellen, ACh = Acetylcholin, $\alpha 7$ nAChR = $\alpha 7$ nicotinerge Acetylcholinrezeptoren, NA = Noradrenalin, β aR = β adrenerge Rezeptoren, LPS = Lipopolysaccharid. Modifiziert nach [310]

5 Sepsis assoziiertes Delirium

Eine der häufigsten Komplikationen der Sepsis stellt das Sepsis assoziierte Delirium (SAD) dar. Es betrifft je nach Autor 9-71 % der Sepsispatienten und ist zumeist mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden [468, 571]. Das SAD stellt eine Dysfunktion des Gehirns dar, die mit verminderter kognitiver Leistung, Konzentrationsschwäche, Verwirrtheit, Desorientierung, Persönlichkeitsänderungen, Bewusstseinsveränderungen bis hin zum Koma oder auch Krampfanfällen einhergeht [475, 571]. Dies ist nicht nur ein Problem der akuten Erkrankung, sondern beeinträchtigt auch die Lebensqualität nach einer überstandenen Sepsis. So zeigten Sepsispatienten 6 bis 24 Monate nach einer Sepsis eine verringerte Lern- und Gedächtnisleistung, verbunden mit einer Reduktion des Volumens des linken Hippocampus und EEG Veränderungen [440]. Iwashyna et al. (2012) berichteten sogar von kognitiven Störungen in Patienten 8 Jahre nach überstandener Sepsis [232].

Es sind vielfältige Faktoren bekannt, die zur Entstehung des SAD beitragen können, dennoch sind die pathophysiologischen Zusammenhänge noch nicht im Detail aufgeklärt. Die hauptsächlich in Frage kommenden Mechanismen sind zum einen vaskulärer Natur, wie die Schädigung des Endothels [444] [366] verbunden mit dem Auftreten von Ödemen, dem Zusammenbruch der BBB [349] und Störungen der Mikrozirkulation [444, 484]. Zum anderen spielen inflammatorische Faktoren wie proinflammatorische Mediatoren (bspw. IL-1 β , IL-6, TNF α) [233] sowie oxidativer Stress [46], Apoptose und eine gestörte Synthese und Verteilung von Neurotransmittern und/oder Aminosäuren [41, 185] eine Rolle. Die meisten dieser Faktoren beeinflussen sich gegenseitig und können nicht streng von einander getrennt werden, weswegen eine multifaktorielle Genese vermutet wird. Dennoch konnte gezeigt werden, dass unter den oben genannten Faktoren besonders der Mikrozirkulation eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Gehirnfunktion zukommt. So konnten Rosengarten et al. (2007) zunächst eine Störung der evozierten zerebralen Durchblutung detektieren, bevor ein Verlust der Amplituden

somatosensorisch evozierter Potentiale (SEP) als Indikator der Gehirnfunktion auftrat [404]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem der evozierte zerebrale Blutfluss als Indikator der Mikrozirkulation untersucht.

Die Diagnose des SAD wird überwiegend über klinische Untersuchungen und die Elektroenzephalographie (EEG) gestellt. Bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie und die kraniale Computertomographie können diese Untersuchungen ergänzen [443].

Die Elektroenzephalographie ist eine hochempfindliche Methode zum Nachweis einer gestörten Gehirnfunktion, bei der bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome Veränderungen im EEG und in evozierten Potentialen nachgewiesen werden können. Das Ausmaß der EEG Veränderungen korreliert mit dem Schweregrad der Gehirndysfunktion und ist wichtig für die weitere Prognose [96, 553]. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit somatosensorisch evozierte Potentiale (SEP) als Indikator der Gehirnfunktion erfasst. Evozierte Potentiale erlauben die Beurteilung der Leitfähigkeit und somit der Funktionsfähigkeit von peripheren und zentralen Nervenbahnen. Dabei wird ein Sinnesorgan oder peripherer Nerv durch einen externen Stimulus gereizt und die dadurch ausgelösten elektrischen Potentiale können in der verarbeitenden Region des zentralen Nervensystems gemessen werden. Je nach Sinnesorgan bzw. peripheren Nerven werden akustisch, visuell, olfaktorisch, motorisch und somatosensorisch evozierte Potentiale unterschieden. Die Messung von SEPs in einem Tiermodell ermöglicht durch elektrische Stimulation des *N. medianus* mit definierten Reizparametern ein hohes Maß an Standardisierung und ist am narkotisierten Tier einfach durchzuführen (siehe Kapitel I 2.4.8) [240, 358, 404].

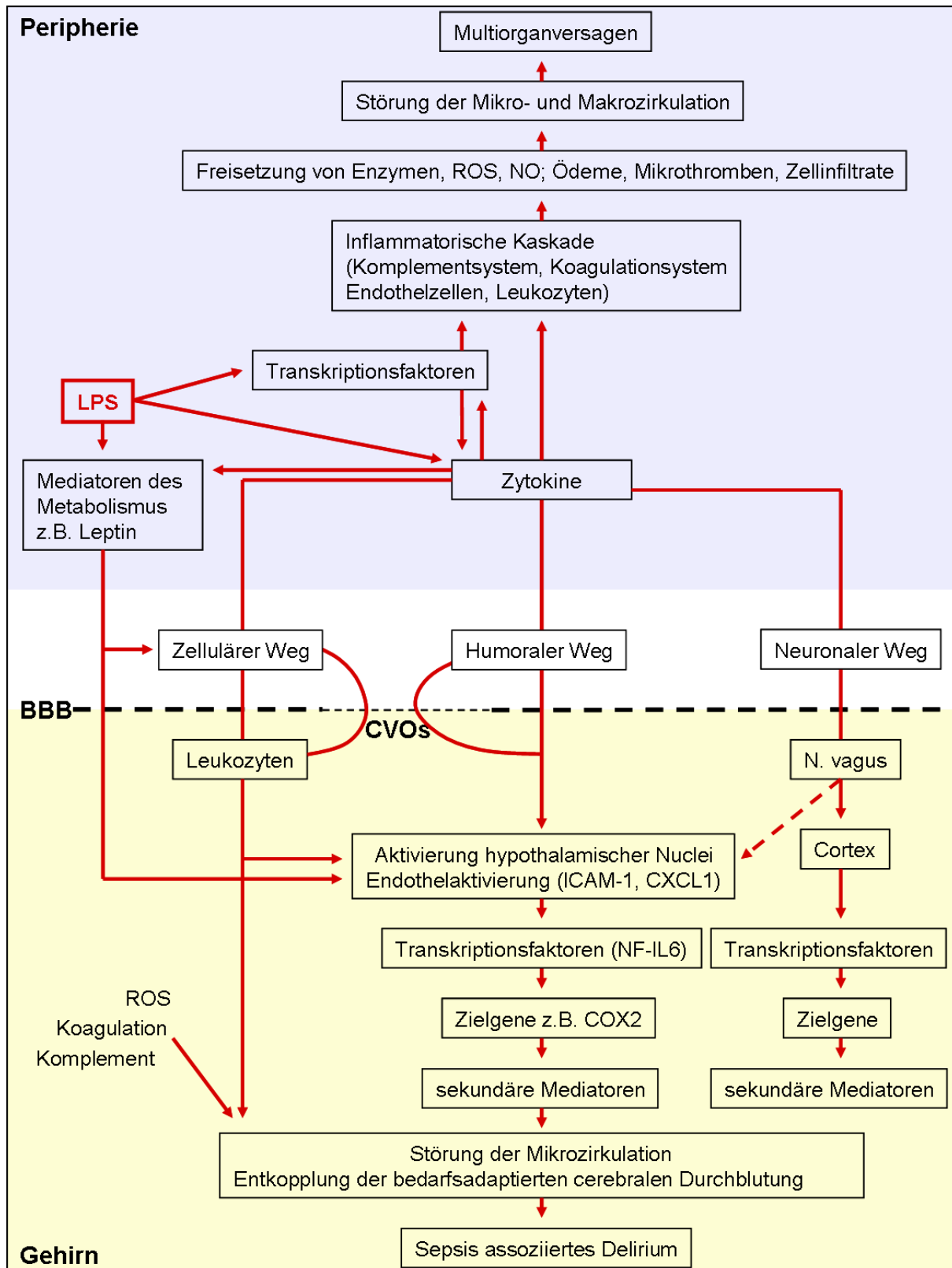


Abbildung 8: Schematische Darstellung der inflammatorischen Kaskade in der Peripherie und im Gehirn nach LPS Stimulation.

LPS führt zu einer inflammatorischen Kaskade, die in Kapitel I 1.3 näher erläutert ist. Zusätzlich findet eine Kommunikation zwischen der Peripherie und dem Gehirn über den humoralen, den zellulären und den neuronalen Weg statt. Dabei interagieren Zytokine und auch Leukozyten mit der BBB oder den CVOs und führen dadurch zu einer Aktivierung hypothalamischer *Nuclei*. Zusätzlich führt LPS zu einer Induktion von Leptin, welches ebenfalls zu einer Aktivierung hypothalamischer

Nuclei beiträgt und außerdem die Einwanderung NG ins Gehirn unterstützt. Im Gehirn können NG zum einen neurotoxisch wirken und zum anderen über eine Interaktion mit dem Endothel zur Störung der Mikrozirkulation beitragen. Über den neuronalen Kommunikationsweg können zusätzlich proinflammatorische Signale über afferente Anteile des *N. vagus* an das Gehirn vermittelt werden.

Im Zuge der hypothalamischen Aktivierung kommt es zur Induktion proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Zielgenen regulieren und zu einer Freisetzung sekundärer Mediatoren führen. Diese können zusammen mit Leukozyten zu einer Störung der Mikrozirkulation führen, die als wichtiger Motor des Organversagens angesehen wird. Schließlich folgt eine Störung der Gehirnfunktion, die sich als SAD äußern kann.

ROS = „reactive oxygen species“, NO = Stickstoffmonoxid, LPS = Lipopolysaccharid, BBB = Blut-Hirn-Schranke, CVO = *Circumventrikuläres Organ*, ICAM = „intercellular adhesion molecule“, COX = Cyclooxygenase, NF-IL6 = „nuclear factor IL-6“

6 Mikrozirkulation

Das ZNS stellt einen hoch spezialisierten Zellverband dar, für dessen Funktion zum einen die Aufrechterhaltung der Homöostase und zum anderen die adäquate Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff essentiell sind. Die Mikrozirkulation des Gehirns spielt dabei eine zentrale Rolle. Deshalb soll im Folgenden auf einige ZNS spezifische anatomische Strukturen und Mechanismen, welche mit der Mikrozirkulation verknüpft sind, eingegangen werden.

6.1 Die Neurovaskuläre Einheit

Die neurovaskuläre Einheit besteht aus dem zirkulierenden Blut und dem Endothel, welchem Perizyten / glatte Muskelzellen aufgelagert sind, umgeben von der extrazelluläre Matrix und der Basalmembran. Diese wird von Astrozytenendfüßchen umschlossen und die Astrozyten stehen wiederum in Kontakt mit Mikrogliazellen, Interneuronen und Neuronen [338]. Durch diese enge Vernetzung können Neurone direkt oder über Interneurone Informationen an Astrozyten übermitteln, welche über Perizyten und glatte Muskelzellen eine Vasodilatation oder Vasokonstriktion vermitteln [346].

Die neurovaskuläre Einheit stellt somit eine anatomische und funktionelle Einheit dar, welche nicht nur eine Barrierefunktion ausübt, sondern insbesondere für die spezifische Regulation des zerebralen Blutflusses verantwortlich ist. Ein wichtiger Mechanismus der bedarfsadaptierten Gehirndurchblutung ist die neurovaskuläre Kopplung.

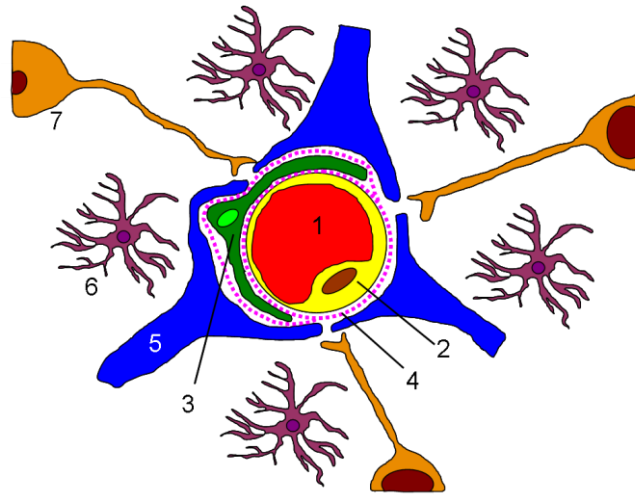


Abbildung 9: Schematische Übersicht über die Neurovaskuläre Einheit. Das zirkulierende Blut (1) wird von Endothelzellen (2) umschlossen, an welche sich Perizyten (3) anlagern. Zusammen werden sie von einer Basalmembran (4) umgeben, an die zahlreiche Astrozytenendfüßchen (5) angrenzen. Diese wiederum stehen in engem Kontakt mit Mikrogliazellen (6), und Neuronen (7).
Modifiziert nach [140]

6.2 Neurovaskuläre Kopplung – bedarfsadaptierte Durchblutung

Das Gehirn hat einen hohen Energieumsatz, zu dessen Deckung es ausreichend Sauerstoff und Glukose benötigt. Da es nicht über größere Substratspeicher verfügt ist eine adequate Durchblutung essentiell für die Aufrechterhaltung der Neuronenfunktion. Steigt die neuronale Aktivität, so steigt auch der Energiebedarf. Dabei wird die meiste Energie für die Aufrechterhaltung der Membranpotentiale, sowie die Generierung von Aktionspotentialen benötigt. Um den gesteigerten Energiebedarf zu decken kommt es in Arealen mit gesteigerter neuronaler Aktivität zu einer funktionellen Hyperämie. Der Mechanismus, welcher die bedarfsadaptierte Durchblutung aktivierter Gehirnregionen ermöglicht wird neurovaskuläre Kopplung genannt und durch die neurovaskuläre Einheit vermittelt [214, 414].

Die neurovaskuläre Kopplung kann auf molekularer Ebene über verschiedene Wege ablaufen. Der genaue Mechanismus, die beteiligten Mediatoren und Zellen sind jedoch noch nicht gänzlich bekannt und werden aktuell kontrovers diskutiert [159]. Eine wichtige Rolle scheint jedoch der Neurotransmitter Glutamat zu spielen [158], welcher bei neuronaler Aktivität in den synaptischen Spalt abgegeben wird. Glutamat kann dann entweder über N-methyl-D-aspartat Rezeptoren andere Neurone aktivieren oder aus dem synaptischen Spalt diffundieren und über metabotropische Glutamat Rezeptoren auf Astrozyten wirken [27].

In Neuronen bewirkt Glutamat über einen Kalziumeinstrom die Aktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) und somit die Bildung von NO [158]. NO ist einerseits ein potenter Vasodilatator, andererseits wird ihm jedoch auch eine modulatorische Wirkung zugesprochen [296].

In Astrozyten bewirkt Glutamat wiederum über einen Kalziumeinstrom die Freisetzung von Arachidonsäure durch Lipasen. Die Arachidonsäure wird im Folgenden über Cyclooxygenasen (COX) und Epoxygenasen zum einen zu Prostaglandinen (PG) (v.a. PGE₂) und zum anderen zu Epoxyeicosatriensäure Derivaten (EETs) umgewandelt [18]. Diese induzieren eine Vasodilatation verbunden mit einer Hyperämie [574]. Allerdings kann die Arachidonsäure durch Diffusion zu glatten Muskelzellen in Nachbarschaft des Endothels gelangen, wo sie über ω -Hydroxylasen in den Vasokonstriktor 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) umgewandelt wird [282, 335].

Des Weiteren besteht eine sehr komplexe und vielfältige Regulation der neurovaskulären Kopplung, die sich auch zwischen einzelnen Gehirnregionen unterscheidet. So beeinflussen sich zum einen die oben genannten Wege gegenseitig, zum anderen werden sie durch den Sauerstoffpartialdruck, teilweise Laktat- und Adenosinkonzentrationen sowie die NO Konzentration beeinflusst und moduliert [27, 214].

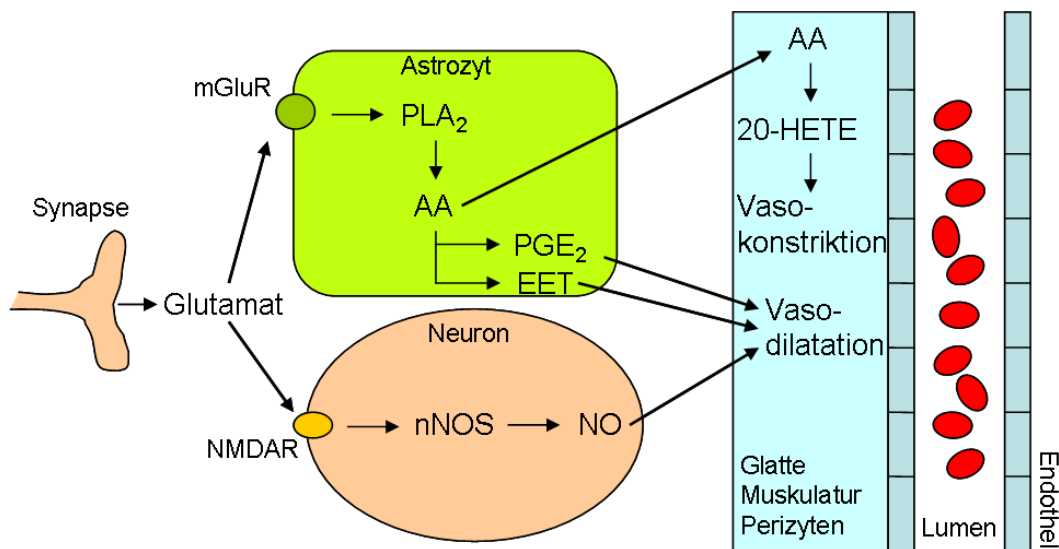


Abbildung 10: Stark vereinfachtes Schema der molekularen Mechanismen der Neurovaskulären Kopplung. mGluR = metabotroper Glutamat Rezeptor, NMDAR = N-methyl-D-aspartat Rezeptor, PLA₂ = Phospholipase A₂, AA = Arachidonsäure, PGE₂ = Prostaglandin E₂, EET = Epoxyeicosatriensäure, nNOS = neuronale Stickstoffmonoxidsynthase, NO = Stickstoffmonoxid, 20-HETE = 20-Hydroxyeicosatetraensäure. Modifiziert nach [27]

Die Funktionsfähigkeit der neurovaskuläre Kopplung kann mittels Laser-Doppler-Flussmetrie gemessen werden und dient in der vorliegenden Arbeit als Indikator für den Zustand der Mikrozirkulation.

6.3 Pathophysiologie der Mikrozirkulation

Unter physiologischen Bedingungen bildet die Mikrozirkulation ein dichtes Netz relativ gleichmäßig durchbluteter Kapillaren. Während einer Sepsis kommt es jedoch zu einer reduzierten funktionellen Kapillardichte. Dies bedeutet, dass nicht perfundierte oder intermittierend perfundierte Kapillaren direkt neben gut durchbluteten Kapillaren auftreten können [118, 121, 155, 486]. Aufgrund einer erhöhten Diffusionsstrecke und einer geringeren Sauerstoffextraktionsfähigkeit resultiert dies in einer hypoxischen Mangelversorgung einzelner Areale, auch wenn der Gesamtblutfluss erhalten bleibt [485]. Dies führt zu einer Zellschädigung und spielt neben anderen Faktoren, eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Organdysfunktionen. Eine progressive Störung der Mikrozirkulation vor allem auch in der frühen Phase der Sepsis ist dabei mit einem schlechteren Krankheitsverlauf verknüpft [120, 427]. Es gibt mehrere Anhaltspunkte dafür, dass Mikrozirkulationsstörungen nicht die Folge, sondern die Ursache eines gestörten Zellmetabolismus sind. Dafür spricht zum einen, dass Mikrozirkulationsstörungen zeitlich vor der Organdysfunktion auftreten [404]. Des Weiteren ist der Sauerstoffpartialdruck in Gebieten mit Mikrozirkulationsstörungen niedrig und der CO₂ Partialdruck hoch, was indiziert, dass der Zellmetabolismus bei Eintreten der Mikrozirkulationsänderung noch intakt war [109, 182]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verbesserung der Mikrozirkulation auch eine Verbesserung der Organfunktion nach sich zieht [500]. Mikrozirkulationsstörungen stellen somit, zumindest in frühen Stadien, reversible Vorgänge dar, die Angriffspunkte für neue Therapieansätze liefern [118, 500]. Als Ursache der Mikrozirkulationsstörungen während einer Sepsis werden multifaktorielle Mechanismen angesehen. Eine wichtige Rolle spielen dabei zum einen eine Endotheldysfunktion, die zu einer verminderten Reaktion auf vasodilatatorische und vasokonstriktorische Mediatoren führt [121]. Zusätzlich werden einige Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der neurovaskulären Kopplung spielen, wie bspw. NO oder PGE₂ (siehe Kapitel I 6.2) im Gehirn auch

durch inflammatorische Stimuli induziert und könnten deshalb mit der bedarfsadaptierten Durchblutung interferieren [162, 407]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LPS die Weiterleitung einer elektrisch induzierten Vasokonstriktion entlang der Arteriolen im *Musculus cremaster* von Mäusen reduzierte [502]. Somit scheint LPS auch die Informationsweiterleitung zwischen Endothelzellen zu beeinträchtigen. Außerdem kann eine gesteigerte Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und eine verminderte Verformbarkeit während einer Sepsis zur Verlegung kleinerer Gefäße führen und dadurch die Mikrozirkulation stören [76, 268, 455, 461]. Zusätzlich kann sich auch eine erhöhte Koagulationsbereitschaft negativ auf die Mikrozirkulation auswirken [119].

7 Ziel der Arbeit

Eine Sepsis stellt ein wichtiges medizinisches Problem dar, welches häufig auch mit neurologischen Symptomen in Form eines Sepsis assoziierten Deliriums einhergeht. Bis heute sind die therapeutischen Möglichkeiten bei einer Sepsis sehr begrenzt und zahlreiche potenzielle Therapieansätze erzielten nicht die gewünschte Wirkung. So wurde in den S-2k Leitlinien von 2010 eine Anwendung von Glukokortikoiden [110, 467], Insulin [77], Antithrombin III [531], Ibuprofen [47], hochdosierten Wachstumshormonen [488], Prostaglandin E₁ [4], hoch dosiertem N-Acetylcystein [329] und „granulocyte colony-stimulating factor“ [400] zur Therapie einer Sepsis nicht empfohlen [391]. Auch andere Therapieansätze wie IL-1ra [364], Antikörper gegen TNF α [3], Antikörper gegen p55 „TNF receptor fusion protein“ [5], Antiendotoxinantikörper [23], TLR4 Antagonisten [496], aktiviertes Protein C [482] und ein „tissue factor pathway inhibitor“ [6] konnten in klinischen Studien nicht überzeugen.

In den letzten Jahren wurde eine Vagusnervstimulation als potenzieller neuer Therapieansatz für inflammatorische Erkrankungen entdeckt. Dabei ist bekannt, dass eine Vagusnervstimulation über eine komplexe, noch nicht vollständig verstandene Verschaltung anti-inflammatorische Effekte in der Peripherie vermittelt [71]. Dabei konnten positive Effekte einer Vagusnervstimulation in einem Endotoxinmodell [565], bei einer CLP [66], bei einer myokardialen Ischämie und Reperfusion [529],

Verbrennungen [276], einem traumatisch hämorrhagischen Schock [292], einem postoperativem Ileus [122] und anderen Modellen [15, 70, 479] im Tierversuch nachgewiesen werden.

Auch eine Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte einen starken anti-inflammatorischen und neuroprotektiven Effekt der Vagusnervstimulation zeigen. So führte die Vagusnervstimulation in einem LPS Modell zu einer Stabilisierung der evozierten Flussantwort und der SEP Amplituden als Indikatoren der zerebralen Mikrozirkulation und der Gehirnfunktion [325]. Eine Vagusnervstimulation scheint sich somit nicht nur auf die Peripherie, sondern auch auf die zentrale Entzündungsantwort positiv auszuwirken und könnte deshalb als mögliche Therapie einer Sepsis und eines SAD in Frage kommen. Durch welche Mechanismen diese positiven Effekte im Gehirn vermittelt werden ist jedoch noch unbekannt. Im Vorfeld der aktuellen Studie hat unsere Arbeitsgruppe mehrere mögliche Faktoren, wie die NO Antwort im Gehirn untersucht. NO ist ein wichtiger Mediator der Mikrozirkulation und eine Studie mit iNOS Knockout Tieren und dem selektiven iNOS Inhibitor L-NIL zeigte eine verminderte LPS bedingte zerebrale Hyperämie und eine Stabilisierung der SEP Amplituden durch die verminderte NO Produktion [436]. Eine Vagusnervstimulation hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Nitrit/Nitrat Konzentration im Plasma und die iNOS mRNA Expression im Cortex, während die Proteinexpression von iNOS im Cortex durch die Vagusnervstimulation sogar leicht erhöht war. Des Weiteren konnten keine Effekte auf den Apoptosemarker Bcl-2 associated X Protein (Bax) beobachtet werden [325]. Die Vagusnervstimulation scheint ihre Wirkung deshalb weder über eine Modulation von NO, noch über eine Verringerung der Apoptoserate zu vermitteln.

Ziel des ersten Abschnitts der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Effekte einer Vagusnervstimulation auf die evozierte Flussantwort und die SEP Amplituden. Im zweiten Abschnitt soll dann die Frage der zugrundeliegenden Mechanismen einer positiven Auswirkung einer Stimulation des *N. vagus* näher beleuchtet werden. Dabei soll zunächst untersucht werden, ob eine Vagusnervstimulation im Gehirn, ähnlich wie in der Peripherie, eine anti-inflammatorische Wirkung entfaltet und so einer sepsisbedingten Hyperinflammation entgegenwirkt. Um dies zu überprüfen wurden periphere und zentrale Zytokine, sowie zentrale Transkriptionsfaktoren untersucht. Als

nächstes soll geklärt werden, ob und wie eine Vagusnervstimulation mit Mediatoren der Mikrozirkulation interagiert. Als Untersuchungsparameter dienten hierbei die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE₂ Synthese COX2 und mPGES-1.

Des Weiteren wird vermutet, dass Leukozyten über den zellulären Weg zu einer zentralen Inflammation beitragen [8, 235]. Eine erste Studie zeigte, dass LPS in Verbindung mit einer Vagotomie zu einer Reduktion von T-Lymphozyten in der Milz führte, die durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation verhindert werden konnte [326]. Die Reduktion der T-Lymphozyten führte jedoch nicht zu einem Anstieg der T-Lymphozyten im Blut [326] und ist auch nicht mit einer erhöhten Apoptoserate zu erklären (siehe Kapitel I 3.2.3) [536, 558]. Demnach scheint es naheliegend, dass es zu einer Marginalisation von Lymphozyten in peripheren Stromgebieten kommen könnte. Eine Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel könnte die Mikrozirkulation negativ beeinflussen [76, 461]. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine Vagusnervstimulation Auswirkungen auf unterschiedliche Komponenten der zellulären Immunantwort im Gehirn vermittelt. In diesem Zusammenhang soll zunächst ermittelt werden, ob eine efferente Vagusnervstimulation die LPS bedingte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) und Chemokinen (CXCL1) im Gehirn verändert. Des Weiteren soll die Auswirkung einer Vagusnervstimulation auf die mikrogliale Aktivierung, sowie auf die Anzahl NG und Lymphozyten im Gehirn 4,5 Stunden nach LPS Applikation untersucht werden. Neben den Effekten einer Vagusnervstimulation auf die reine Anzahl NG sollen zusätzlich auch Veränderungen der Interaktion zwischen NG und dem Endothel bestimmt werden.

Als besondere Begebenheit ist dabei zu beachten, dass das Gehirn Regionen aufweist, die aufgrund der BBB von der Peripherie getrennt sind und solche, die aufgrund des Fehlens einer intakten BBB für eine Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS über den humoralen Weg prädisponiert sind [412]. Des Weiteren trägt auch der *N. vagus* über den neuronalen Weg zur Kommunikation zwischen der Peripherie und dem Gehirn bei [115]. Um differenzierte Ergebnisse einer Modulation der Entzündungsreaktion im Gehirn durch eine efferente Vagusnervstimulation zu erzielen, soll in der vorliegenden Studie deshalb der Cortex und der Hypothalamus gesondert untersucht werden.

II. Material und Methoden

1 Verwendete Materialien allgemein

Tabelle 1: Gebrauchsmaterialien – allgemein

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Glasflaschen	Verschiedene Volumina	Schott AG, Mainz
Magnetrührstäbchen	PTFE ummantelt	Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben	Klasse A, 500 ml, 2 l, 5 l	Roth GmbH, Karlsruhe
Messzylinder	Klasse A, 100 ml, 1 l	Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten	Verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäßständer		Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial - allgemein

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Pipettenspitzen mit Filter	Verschiedene Größen: 10-, 100-, 1000µl	Fa Eppendorf-Natheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	Verschiedene Größen: 10-, 100-, 1000µl	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Schraubdeckeldosen	Verschieden Volumina	Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalhandschuhe	Latex	UNIGLOVES® GmbH, Troisdorf
Einmalhandschuhe N-Dex®	Nitril	Best Manufacturing Company, Menlo, GA, USA
Labortücher	Kimtech Science	Kimberley-Clark Europe Limited, Reigate, England
Parafilm®		Roth Laborbedarf, Karlsruhe
Safe-Lock-Tubes	Reaktionsgefäße 3810, 0,5-, 1,5-, 2 ml	Fa Eppendorf-Natheler-Hinz GmbH, Hamburg
Alufolie		Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 3: Software

Programm	Hersteller
Adobe® Photoshop® CS2 Version 9.0	Adobe Systems GmbH, München
GraphPad Prism®, Version 5.02	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
StatView®, Version 5.0.1	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
Metamorph, Version 5.05	Diagnostic Instruments – Visitron Systems, Puchheim
Windows Microsoft Excel, 2003	Microsoft Corporation, München
Windows Microsoft Word, 2003	Microsoft Corporation, München
Fiji (<i>Fiji Is Just ImageJ</i>) Version Mai 2014	Open source basierend auf ImageJ modifiziert nach BioVoxxel, Mutterstadt; Schneider et al. Nat. Methods, vol. 9, no. 7, pp. 671-675, 2012; Schindelin et al. Nat. Methods, vol. 9 no. 7, pp. 676-682, 2012
Neurodyn Auswertungssoftware	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Step One Software Version 2.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Endnote X3	Thomas Reuters, Philadelphia, PA, USA
DataAssist™ 3.01	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NormFinder Version 4	Department of Molecular Medicine (MOMA) Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

2 *In vivo* Versuch

2.1 Materialien für den Tierversuch

Tabelle 4: Technische Geräte - Tierversuch

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Magnetrührer	IKA - Combimag RCT	IKAR Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Isofluranpumpe	ARDB - 0715	Dräger Safety AG & Co. KG, Lübeck
Perfusor	SP210IWZ Syringe Pump Modelnr. KDS-210-CE	World Precision Instruments, Berlin
Laser Doppler	Laser Flow BRL – 100	BRC Bio Research Center Co.,Ltd, Nagoya, Japan
Druckaufnehmer	Combitrans 1-fach Set Mod. II Uni Giessen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Beatmungspumpe	SAR - 830/P Ventilator	Dwyer Instruments Inc. Michigan City, IN, USA
Blutzuckermessgerät	Glucometer Elite® XL	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Laktatmessgerät	Lactate Pro™	Arkray Inc., Kyoto Japan
Blutgasmessgerät	Rapidlab™ 348	Bayer Health Care, NY, Tarrytown, USA
Thermostat	Model BAT-12	Physitemp Instruments INC., Clifton, NJ, USA
Elektrokauter	Aaron 900™, High Frequency Desiccator	Aaron Medical Industries, St. Petersburg, FL, USA
Schnell drehendes Multifunktionswerkzeug	Dremel® Dremel Moto - flex 250Watt 22.000 Umdrehungen	Dremel Europe, Breda, Niederlande
Lichtquelle 1	KL 200	Schott AG, Mitterteich
Lichtquelle 2	Hanaulux® Heidelberg OP Lampe	HN Sunlight GmbH Original Hanau, Hanau
Stereomikroskop	Olympus SZ 40	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Stereotaktischer Kopfrahm		Eigenentwicklung
Halter für EEG Elektrode		Eigenentwicklung
Auswertungscomputer	Pentium III, Windows98	
Verstärker		Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March - Hugstetten
Absaugpumpe	N035.1.2AN.18 Baujahr 2001	KNF Neuberger GmbH, Freiburg

Tabelle 5: Gebrauchsmaterialien – Tierversuch

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Kleine Graviermesser	Nummer 107 für Dremel®	Dremel Europe, Breda, Niederlande
Wundspreizer	Wundspreizer nach Logan Modell Reill	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Gefäßclip	Micro-Serrefine Clip	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Clip Applicator	Micro-Serrefine Clip Applying Forceps	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Tubus	Gekürzt auf 1,5 cm	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Schere 1	Anatomische Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Schere 2	Nachstarschere nach Vannas	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Schere 3	Feine Iris Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Anatomische Pinzette 1	Gekrümmte anatomische Irispinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Anatomische Pinzette 2	Anatomische gekrümmte, spitze Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
EEG Elektrode different		
EEG Elektrode indifferent		
Nadelelektroden	Disposable Scalp Needle Electrode 10 mm x 0,3 mm	Medtronic A/S, Skovlunde, Denmark
Nervenstimulator (für den <i>N. vagus</i>)		Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March - Hugstetten

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien - Tierversuch

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Mikropipetten - Hämatokritkapillaren	Blaubrand® intraMark Mikropipetten 50 µl	Brand GmbH und CO KG, Wertheim
Einmalspritze	Injekt® – F, 1 ml, 5 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Perfusorspritze	Omnifix®, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Polyethylenschlauch	Portex™ Fine Bore Polythene Tubing 0.58 mm ID, 0.96 mm OD	Smiths Medical ASD, Inc Keene, NH, USA
Kanülen	BD Microlance™ 3, 23 G, 26 G	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Mehrweghahn	Discofix® C	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Adapter	Combifix® Adapter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Infusionsleitung	Infusionsleitung flexible PE / farbcodiert, 30 cm, 1,0 mm ID, 2,0 mm AD	Primed Halberstadt Medizintechnik GmbH, Halberstadt
Filter	Acrodisc® Syringe Filter	Pall International Sàrl, Fribourg, Schweiz
Blutzuckermessstreifen	Elite Sensor	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Laktatmessstreifen	Lactate Pro™ Test Strip	Arkray Inc., Kyoto, Japan
Faden	Mercifil 400 No. 12 100 % Baumwolle	Amann & Söhne GmbH und Co. KG, Bönnigheim
Klebeband	3M Durapore™ 1,25 cm x 9,1 m	3M Healthcare GmbH Health Care Business, Neuss
Tissue Tek®		Sakura Finetek USA Inc. Torrance,

		CA, USA
Gefrierbehälter	Tissue-Tek®v Cryomold® 25 mm x 20 mm x 5 mm	Sakura Finetek USA Inc. Torrance, CA, USA
Tupfer	Pur-Zellin®, nicht steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim

Tabelle 7: Substanzen und Chemikalien – Tierversuch

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
Isofluran	Baxter Detuschland GmbH, Unterschleißheim
Gasgemisch: 50 % Sauerstoff, 50 % Stickstoff	Praxair Deutschland GmbH, Düsseldorf
Isotone Natriumchloridinjektionslösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid 7,45 %, gefärbt	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Heparin-Natrium 2500 I.E.	Ratiopharm GmbH, Ulm
α-Chloralose	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumtetraborat, 99 % (Borax)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloralosestammlösung	Lösen von 300 mg Borax und 250 mg α-Chloralose in 10 ml 0,9 % Natriumchloridlösung unter Rühren bei 40 °C. Nach Erreichen einer ungetrübten Lösung Filtration durch einen Filteraufsatz.
Pancuronium Inresa, Pancuroniumbromid, 4 mg/2 ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg
Glucose 40 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ringer - Lösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Infusionslösung	1 ml Pancuronium, 3 ml 40 % Glukoselösung und 6 ml Ringerlösung
Lipopolysaccharid E.coli, O111:B4, L2630, LOT 091M4031V	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Flüssiger Stickstoff	Linde AG, Pullach

2.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 280 und 350 g durchgeführt. Die Tiere wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig Universität Gießen nach aktuellen FELASA („Federation of European Laboratory Animal Science Associations“) Richtlinien gehalten.

Die Versuche wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidium Gießens (Aktenzeichen: GI 20/18 – Nr. 81/2011) durchgeführt.

2.3 Versuchsprotokoll

Für die Versuchsdurchführung wurden 60 Raten zufällig in 4 Gruppen aufgeteilt.

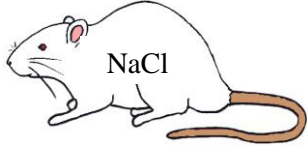
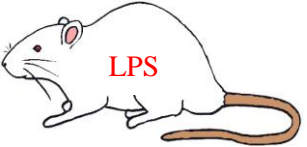


Kontrolle		Die erste Gruppe diente als Kontrolle (Ko) um zu gewährleisten, dass die gefundenen Veränderungen nicht durch die Versuchsprozedur an sich verursacht wurden. Die Tiere dieser Gruppe erhielten weder LPS noch eine Manipulation des <i>N. vagus</i> . Stattdessen erhielten sie 500 µl/300 g Körpergewicht (KG) 0,9 % NaCl-Lösung.
LPS		Alle weiteren Gruppen erhielten 5 mg/kg KG LPS gelöst in 500 µl/300 g KG 0,9 % NaCl-Lösung. Die Tiere der zweiten Gruppe (LPS) erhielten ausschließlich LPS und dienten als Referenz für die durch das LPS induzierten Veränderungen.
LPS + Vagotomie		In der dritten Gruppe wurde zusätzlich zur LPS Injektion eine beidseitige Vagotomie durchgeführt (LPS+VGX). Diese Gruppe simuliert eine völlige Ausschaltung sowohl afferenter als auch efferenter vagaler Innervation.
LPS + Vagotomie + Vagusnervstimulation		Die Tiere der letzten Gruppe erhielten LPS, eine beidseitige Vagotomie und eine Stimulation des linken distalen Nervus vagus (LPS+VGX+VNS), sodass die Effekte einer ausschließlich efferenten Vagusnervstimulation untersucht werden konnten.

Abbildung 11: Einteilung der Versuchstiere in vier Gruppen: Kontrolle, LPS, LPS+VGX, LPS+VGX+VNS

2.4 Operative Präparation der Versuchstiere

Die im Folgenden beschriebene Präparation dauerte insgesamt etwa eine Stunde.

2.4.1 Inhalationsnarkose

Als Grundlage für die Dosierungsberechnung im weiteren Versuch wurde zunächst das Körpergewicht der Ratte ermittelt. Anschließend wurde in einer Glasglocke mit Hilfe eines in Isofluran getränkten Wattebausches eine Isofluran Anreicherung der Luft erreicht. Daraufhin wurde die Ratte für 1 bis 2 Minuten in die Glasglocke verbracht. Nach Eintritt der Narkose wurde das Tier in Rückenlage auf die Wärmeplatte gelegt und der Kopf in eine Atemmaske verbracht. Über die Beatmungsmaske wurde die Inhalationsnarkose durch 2-3 % Isofluran, je nach Bedarf des Tieres, in einem Gasgemisch aus 50 % Sauerstoff und 50 % Stickstoff aufrechterhalten. Um ein Auskühlen des Tieres zu verhindern wurde die Körperinnentemperatur durch eine Wärmematte im physiologischen Bereich gehalten. Zur Überprüfung diente eine rektal eingeführte Temperatursonde, welche die Körperinnentemperatur kontinuierlich anzeigte. Vor Beginn des chirurgischen Eingriffs wurde durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes gewährleistet, dass sich das Tier im Toleranzstadium befand.

2.4.2 Kanülierung der *Arteria* und *Vena femoralis*

Vor Beginn der Operation wurde der venöse Katheter luftblasenfrei mit Chloraloselösung befüllt. Der arterielle Katheter wurde, ebenfalls luftblasenfrei, mit einem Natriumchlorid-Heparin-Gemisch (100 I.E. Heparin/ml) befüllt um einer Thrombosierung der *Arteria (A.) femoralis* vorzubeugen.

Um die Hinterbeine des auf dem Rücken liegenden Tiers zu fixieren wurden sie in Abduktionsstellung mit Klebeband auf der Heizplatte festgeklebt. Daraufhin wurde das Operationsfeld (OP Feld) desinfiziert und ein ca. 1 bis 1,5 cm langer Hautschnitt an der Innenseite des rechten Hinterbeins gesetzt. Das freiliegende Fett- und Bindegewebe wurde durch stumpfes Präparieren entfernt, sodass die *A. femoralis*, *Vena (V.) femoralis* und der *Nervus femoralis* sichtbar wurden. Mit einer Irispinzette wurden die Gefäße von einander und von der umliegenden Bindegewebsschicht getrennt. Als nächstes wurde die *V. femoralis* distal durch eine Ligatur verschlossen und proximal davon eine offene Ligatur vorgelegt. Daraufhin wurde zwischen den

beiden Ligaturen mit einer Nachstarschere nach Vannas ein Einschnitt in die Gefäßwand gesetzt. Der mit Chloraloselösung gefüllte Katheter wurde durch die Inzision in die Vene verbracht, bis zur *Vena cava inferior* vorgeschoben und die offene Ligatur zur Fixierung des Katheters geschlossen.

Als Nächstes erfolgte die Kanülierung der *A. femoralis*. Hierfür wurde zunächst eine offene Ligatur vorgelegt. Außerdem wurde proximal der Ligatur ein Gefäßclip gesetzt und somit die Blutzufuhr reversibel unterbrochen um Blutungen während des Vorschiebens des Katheters zu verhindern. Anschließend wurde distal der offenen Ligatur und des Gefäßclips ein Einschnitt gesetzt und der Katheter in das Gefäß verbracht. Zunächst wurde der Katheter bis zum Erreichen des Gefäßclips vorgeschoben, dann wurde dieser entfernt und der Katheter konnte bis zu seiner endgültigen Lage vorgeschoben und mit der vorgelegten Ligatur fixiert werden. Nun wurde über einen Druckaufnehmer kontinuierlich der Blutdruck gemessen und die Daten an den Computer übertragen. Beide Katheter wurden anschließend durch eine Massensligatur am Bein fixiert und mittels Klebeband auf Höhe der Achillessehne und des Metatarsus festgeklebt.

2.4.3 Injektionsnarkose und Muskelrelaxation

Im Laufe des Versuchs wurde die Narkose von Isofluran auf α -Chloralose umgestellt. Dafür wurden direkt vor der Inzision der Trachea ein Bolus von 0,3 ml Infusionslösung und 60 mg/kg Chloralose über den venösen Katheter verabreicht und anschließend die Perfusoren zur kontinuierlichen Applikation der Erhaltungsdosis gestartet. Die Erhaltungsdosis betrug für die α -Chloralose 40 mg/kg/h und für die Infusionslösung 4 μ l/g/h.

Zur Herstellung der Chloralosestammlösung wurden 300 mg Borax und 250 mg α -Chloralose in 10 ml 0,9 % Natriumchloridlösung bei 40 °C mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst. Nachdem die Chloralosestammlösung ungetrübt und frei von Boraxkristallen war, wurde das Gemisch durch einen Filteraufsatz filtriert. Für die Infusionslösung wurden 1 ml Pancuronium, 3 ml 40 % Glukoselösung und 6 ml Ringerlösung verwendet.

Da Chloralose ca. 20 min benötigt um vollständig anzufuten, wurde ab dem Applikationszeitpunkt die Isoflurankonzentration alle 5 min um 0,5 bis 1 % verringert.

Außerdem wurde eine Auswaschzeit von einer Stunde vor Versuchsbeginn eingehalten, um Isofluran vermittelte Effekte auszuschließen.

2.4.4 Tracheotomie, Intubation und Beatmung

Für die Tracheotomie und Intubation wurde der Halsbereich medio-cranial des Sternums mit Desinfektionsspray besprüht und ein ca. 2 x 1 cm langer Hautschnitt durchgeführt. Dabei wurden die Halsmuskulatur und Speicheldrüsen freigelegt. Diese wurden mit der Irispinzette stumpf auseinander präpariert und mittels Wundspreizern auseinandergehalten, sodass die Trachea sichtbar wurde. Diese wurde mit einer offenen Ligatur zur späteren Fixierung des Tubus unterlegt.

Als nächstes erfolgte die Umstellung auf eine α -Chloralosenarkose. Dafür erhielten die Tiere einen Bolus α -Chloralose- und Infusionslösung und die Perfusoren für die kontinuierliche Applikation wurden gestartet. Anschließend kam es durch das Muskelrelaxanz Pancuronium zu einem Ausfall der Spontanatmung, sodass eine maschinelle Beatmung ermöglicht wurde.

Mit einer Nachstarschere nach Vannas wurde zwischen dem 4. und 5. Trachealring eine Inzision gesetzt, durch welche der Tubus eingeführt wurde. Die Beatmungsmaske wurde entfernt und der Tubus mit dem Beatmungsgerät verbunden und anschließend mit der Ligatur fixiert. Um Schädigungen durch eine Hypoventilation zu vermeiden mussten diese Arbeitsschritte zügig vorgenommen werden. Die maschinelle Beatmung wurde mit einer Atemfrequenz von 60 Atemzügen pro Minute, einer Inspirationszeit von 0,75 Sekunden und einem Atemdruckvolumen von 700 ccm pro Minute bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 4 cm Wassersäule durchgeführt.

2.4.5 Präparation des *Nervus vagus*

Der cervikale *N. vagus* wurde auf beiden Seiten aufgesucht und mit Hilfe einer Irispinzette von der gemeinsam verlaufenden *Arteria carotis communis* getrennt. Dabei wurde darauf geachtet weder Nervenfasern noch Gefäße zu verletzen. Um eine gute Sicht auf den *N. vagus* zu gewährleisten wurde das umliegende Gewebe durch Wundspreizer auseinander gehalten.

Bei der Kontrollgruppe und der LPS Gruppe endete die Präparation an diesem Punkt.

Bei der zusätzlich vagotomierten Gruppe hingegen wurde der rechte und linke *N. vagus* durchtrennt und bei der vagotomierten und vagusnervstimulierten Gruppe wurde zusätzlich am distalen Teil des linken durchtrennten Nerven die Stimulationselektroden angebracht.

Für die Stimulierung des *N. vagus* wurde ein elektrischer Strom mit einer Stromstärke von 1,5 mA, einer Pulsweite von 0,3 ms und einer Frequenz von 2 Hz verwendet. Die Stimulation wurde vor Verabreichen des LPS begonnen und während des Versuchs nur für die Messung der neurophysiologischen Parameter unterbrochen. Die Vagotomie und / oder das Anbringen der Stimulationselektroden erfolgten nach der Schädelpräparation und dem Drehen des Tieres (siehe Kapitel I 2.4.6).

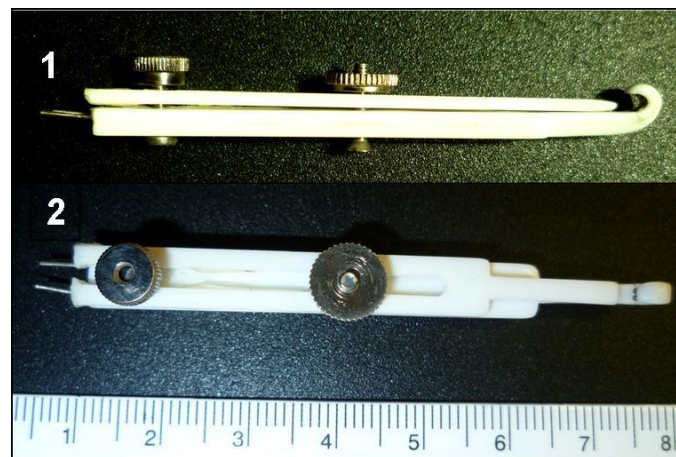


Abbildung 12: Darstellung der Nervenstimulationselektroden für die Stimulation des *N. vagus*; Aufsicht von der Seite (1) und von oben (2).

2.4.6 Schädelpräparation

An diesem Punkt wurde das Tier auf den Bauch gedreht und in einem drehbaren stereotaktischen Kopffahmen fixiert. Dabei ist darauf zu achten den Kopf durch Bolzen, die in den äußeren Gehörgang eingeführt wurden sicher zu fixieren, das Trommelfell jedoch nicht zu perforieren.

Dann wurde mit einer Metzenbaum-Präparierschere ein etwa 1 cm langer und 1 cm breiter Hautschnitt auf Höhe der linken Schädelcalotte durchgeführt und das darunterliegende Bindegewebe und Muskulatur mit Hilfe einer Irispinzette entfernt. Etwaig auftretende Blutungen wurden mit Hilfe eines Elektrokauters gestillt. Mit Hilfe der Metzenbaumschere wurde von diesem Schnitt ausgehend die Haut des Nasenrückens untertunnelt um später die indifferente Elektrode für das EEG auf dem

Nasenbein platzieren zu können (siehe Kapitel I 2.4.8). Um die Messungen mittels Laser-Doppler zu ermöglichen wurde der nun freiliegende Schädelknochen mittels eines wassergekühlten Bohrers auf einer Fläche von ca. 0,5 x 0,5 cm bis zur *Compacta interna* ausgedünnt, sodass die darunter liegenden Gefäße durchschimmerten. Dabei wurde unter mikroskopischer Sichtkontrolle darauf geachtet, dass weder die *Dura mater* noch das darunter liegende Gehirn geschädigt wurden.

Danach wurde der stereotaktische Rahmen um 45 Grad gedreht und die Vagotomie durchgeführt und/oder die Stimulationselektroden an den *N. vagus* angebracht (siehe Kapitel I 2.4.5).

2.4.7 Die Laser-Doppler-Flussmetrie – Erfassung des evozierten Blutflusses

Zur Beurteilung der zerebralen Mikrozirkulation und der neurovaskulären Kopplung wurde in der vorliegenden Arbeit eine Laser-Doppler-Flussmetrie (LDF) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Frequenzverschiebung von Laserlicht entsprechend des Doppler-Effekts, wenn dieses auf Schwebeteilchen (bspw. Erythrozyten) einer bewegten Flüssigkeit (bspw. Blut) trifft. Die Frequenzverschiebung ist dabei abhängig von der Geschwindigkeit der bewegten Teilchen und ist somit ein Maß für die Blutflussgeschwindigkeit. Die LDF-Messung besitzt mit einer Eindringtiefe von 1 mm und einer Messfrequenz von 10 ms eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung [133, 315]. Dies ermöglicht eine kontinuierliche Messung der relativen Änderung der lokalen zerebralen Durchblutung über die Veränderung der Blutflussgeschwindigkeit [130]. Im vorliegenden Modell wurde zunächst der corticale Ruheblutfluss gemessen. Anschließend wurde durch Applikation eines somatosensorischen Reizes, entsprechend des Prinzips der neurovaskulären Kopplung, eine Änderung der Blutflussgeschwindigkeit induziert. Diese zeigte einen typischen Verlauf, gekennzeichnet durch einen starken Anstieg, eine Plateau-Phase und nach Beendigung der Stimulation einen raschen Abfall auf das Niveau des Ruheflusses.

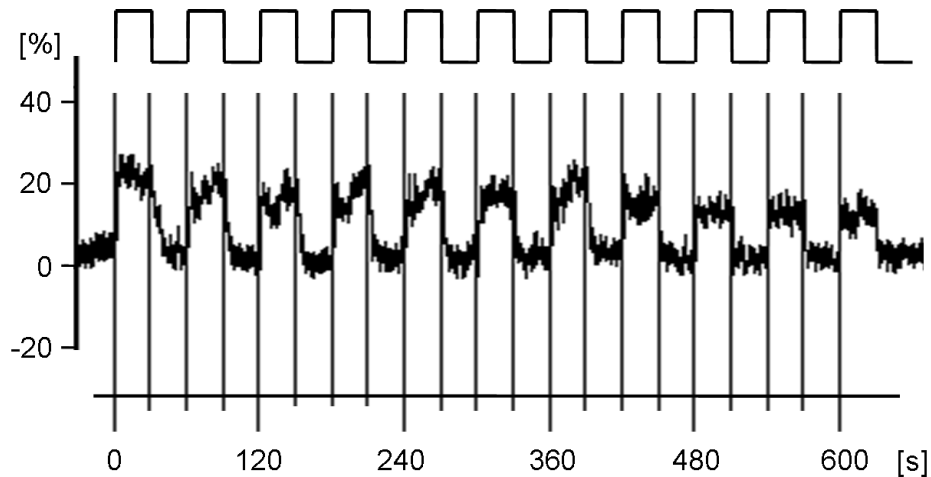


Abbildung 13: Darstellung der relativen Blutflussgeschwindigkeit im somatosensorischen Cortex bezogen auf die Ruheblutflussgeschwindigkeit.

Im oberen Bereich ist die Blutflussgeschwindigkeit schematisch dargestellt, während der untere Bereich das Original LDF-Signal zeigt. Dargestellt sind 11 Zyklen von jeweils 30 Sekunden Stimulation der contralateralen Vorderpfote und 30 Sekunden Ruhephase.

Zur Auslösung der evozierten Flussantwort wurde ein somatosensorischer Reiz in Form eines elektrischen Stimulus am *Nervus medianus* des rechten Metakarpus verwendet. Hierfür wurde eine Nadelelektrode subcutan und daneben eine weitere Nadelelektrode intramuskulär eingebracht. Die Stimulation erfolgte mit bipolaren elektrischen Impulsen von 0,3 ms Dauer und einer Stärke von 1,5 mA bei einer Repetitionsfrequenz von 2 Hz. Der verwendete Stimulus lag unterhalb der Schmerzschwelle, sodass die weiteren Versuchsdaten hiervon unbeeinflusst blieben.

Die evozierte Flussantwort wurde einmal stündlich für jeweils 10 min erfasst. Eine Messung setzte sich dabei aus 10 Stimulationszyklen zusammen, wobei ein Zyklus jeweils aus 30 Sekunden Stimulation gefolgt von 30 Sekunden Ruhephase bestand.

Für die Messungen wurde die Laser-Doppler-Sonde, entsprechend dem Vorderpfotenareal des somatosensorischen Cortex, ca. 3,5 mm lateral des *Bregmas* und 1 mm cranial bis caudal der *Sutura coronalis* auf der ausgedünnten Schädeldecke positioniert. Die richtige Position der Sonde wurde überprüft indem in Ruhe entsprechend dem kapillären mikrozirkulatorischen Stromgebiet etwa 300 bis 500 Fluxeinheiten gemessen wurden und bei Probestimulationen ein maximaler Anstieg des LDF Signals vorlag.

Für die Auswertung wurden zunächst die Daten einer Messung gemittelt und anschließend auf die individuellen Ruheblutflussgeschwindigkeit relativiert. Dadurch

wurde der prozentuale Anstieg der evozierten Blutflussgeschwindigkeit in Bezug zur Ruheblutflussgeschwindigkeit in Prozent angegeben.

2.4.8 Erfassung der SEPs

Zur Erfassung der SEPs wurde die Potentialdifferenz zwischen einer indifferenten Elektrode über dem Nasenbein und einer differentiellen Elektrode über dem somatosensorischen Cortex gemessen. Die so gewonnen Potentiale wurden für die weitere Auswertung verstärkt und gefiltert. Des Weiteren bedarf es einer Extraktion der SEPs aus dem Spontan-EEG. Hierfür macht man sich zu nutze, dass im Gegensatz zum Spontan-EEG, welches unspezifisch ist, die evozierten Potentiale ereignisbezogen und spezifisch für ihren Reiz sind. Aus diesem Grund treten sie immer im gleichen Zeitintervall nach dem definierten Reiz auf. Da die Stimulation repetitiv erfolgt können die einzelnen Messzeiträume gemittelt werden („Averaging“). Dadurch summieren sich die reizgekoppelten Potentiale auf, während sich der Einfluss der reizunabhängigen EEG-Aktivität vermindert [79]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Stimulation des *N. medianus* mit einer Frequenz von 2 Hz, sodass nach einem Messzeitraum von 30 Sekunden eine Mittelung von 60 Signalen erfolgte.

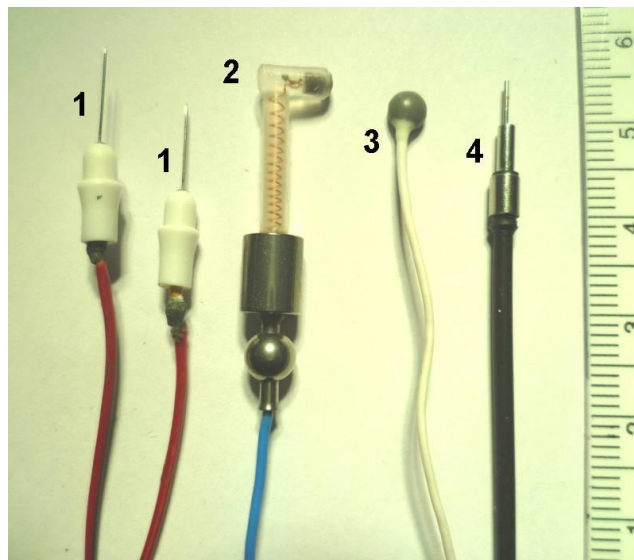


Abbildung 14: Übersicht über die verwendeten Elektroden: ganz links befinden sich die Nadelelektroden (1) zur Stimulation des *N. medianus*. Rechts daneben sind die differente Elektrode (2) und die indifferente Elektrode (3) des EEGs abgebildet. Ganz rechts befindet sich die LDF-Sonde (4).

Vor Versuchsbeginn wurde in einer Probestimulation die korrekte Positionierung der Elektroden überprüft. Eine richtige Position lag dann vor, wenn während der

Stimulation eine repetitive hervorstechende Zacke im EEG sichtbar war. Die Messung der somatosensorisch evozierten Potenziale wurde gleichzeitig mit den Laserdoppler Messungen und mit dem gleichen Stimulationsregime durchgeführt (Impulse von 0,3 ms Dauer und einer Stärke von 1,5 mA bei einer Repetitionsfrequenz von 2 Hz). Die computergestützte Datenerfassung und Speicherung erfolgte mit Hilfe der Neurodyn Software von Hugo Sachs.

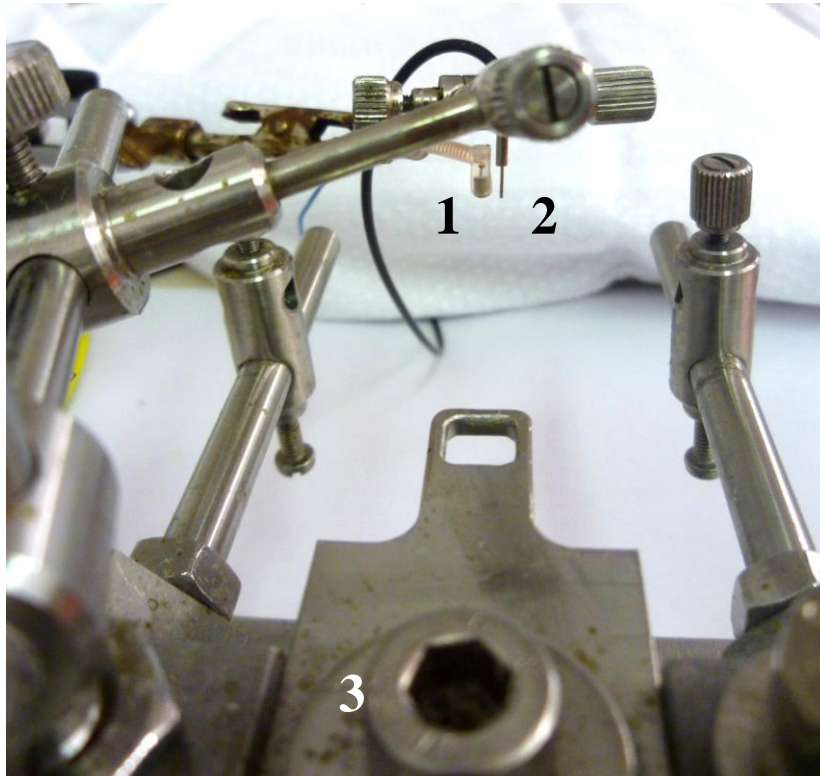


Abbildung 15: Übersicht über die Anordnung der Elektrode des EEGs (1) sowie der Laserdopplersonde (2) im stereotaktischen Halter (3). Aufsicht von vorne, ohne Darstellung der Ohrbolzen.

Die evozierten Potentiale weisen eine charakteristische Wellenform auf, welche durch ihre Amplitude, Polarität und die Zeit bis zum Erreichen eines Gipfels (Latenz) gekennzeichnet sind. Für die Auswertung wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen die Höhe der Amplitude zwischen den Punkten P1 und N2 und zum anderen die Latenz bis zum Punkt P1 ermittelt.

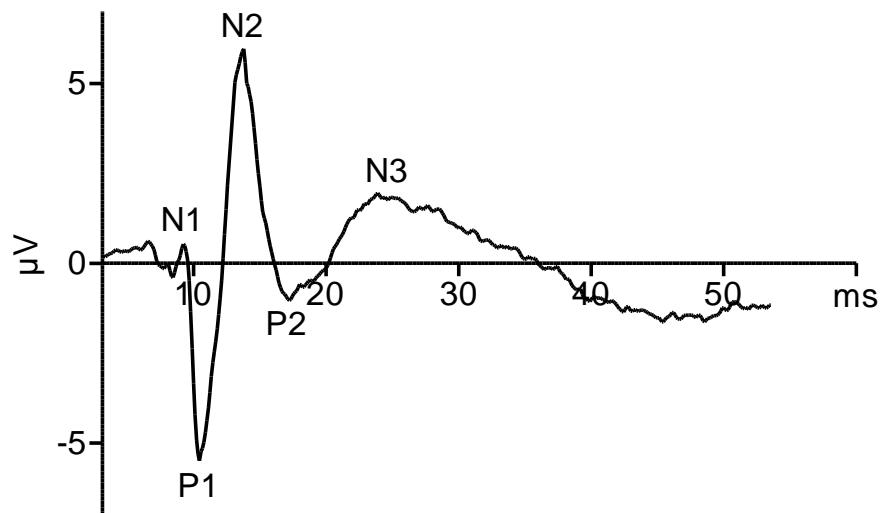


Abbildung 16: Beispiel eines typischen SEPs nach kontralateraler Vorderpfotenstimulation und Mittelung von 60 Signalen. Positive Ausschläge werden mit N bezeichnet und negative Ausschläge mit P.

2.5 Übersicht über den Versuchsaufbau

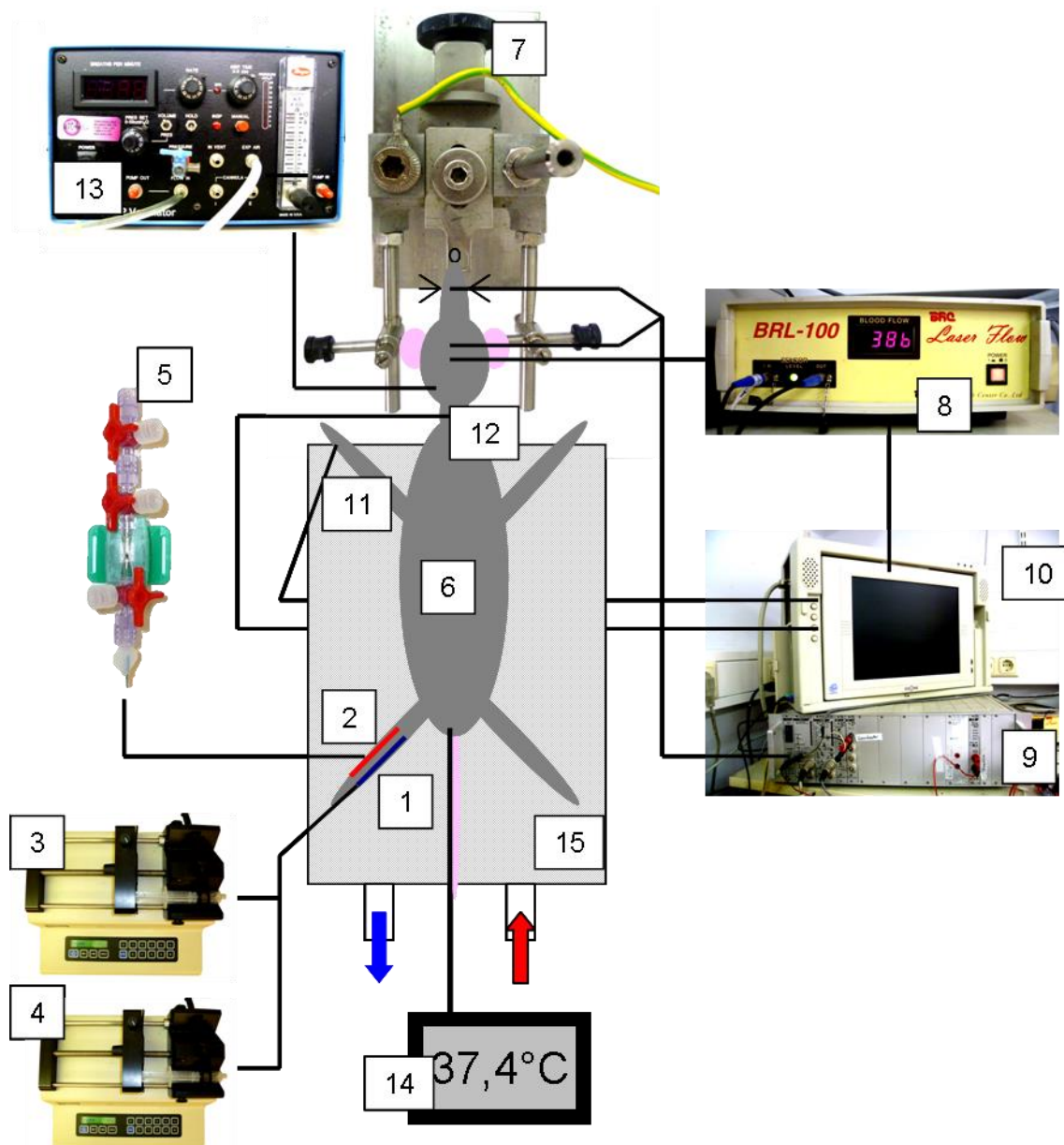


Abbildung 17: Halbschematische Übersicht über den Versuchsaufbau (nicht maßstabsgetreu).

Zunächst erfolgte die Kanülisierung der *V. femoralis* (1) und der *A. femoralis* (2). Die Vene diente der Applikation von LPS, Chloralose- und Infusionslösung über zwei Perfusoren (3,4). Die Arterie wurde für die arterielle Messung des Blutdrucks mittels eines Druckaufnehmers (5) und zur Blutabnahme genutzt. Anschließend erfolgte eine Tracheotomie und Intubation für die maschinelle Beatmung (13). Dann wurde das Tier (6) auf den Bauch gedreht und im stereotaktischen Rahmen (7) fixiert. Anschließend wurde die Schädelchalotte ausgedünnt und die Messeinrichtungen für die Laser-Doppler-Flussmetrie (8) und die Elektroenzephalographie (9) platziert. Die so gewonnenen Daten wurden an einen Auswertungscomputer (10) übertragen. Für die Induktion der neurophysiologischen Parameter wurde eine Stimulation des *N. medianus* (11) verwendet. Schließlich erfolgte die Stimulation des *N. vagus* am linken distalen Anteil des cervicalen *N. vagus* (12). Während der gesamten Versuchsdauer wurde die Körpertemperatur durch eine rektale Temperatursonde (14) gemessen und durch den beheizbaren Tisch (15) im physiologischen Bereich gehalten.

2.6 Zeitlicher Versuchsablauf

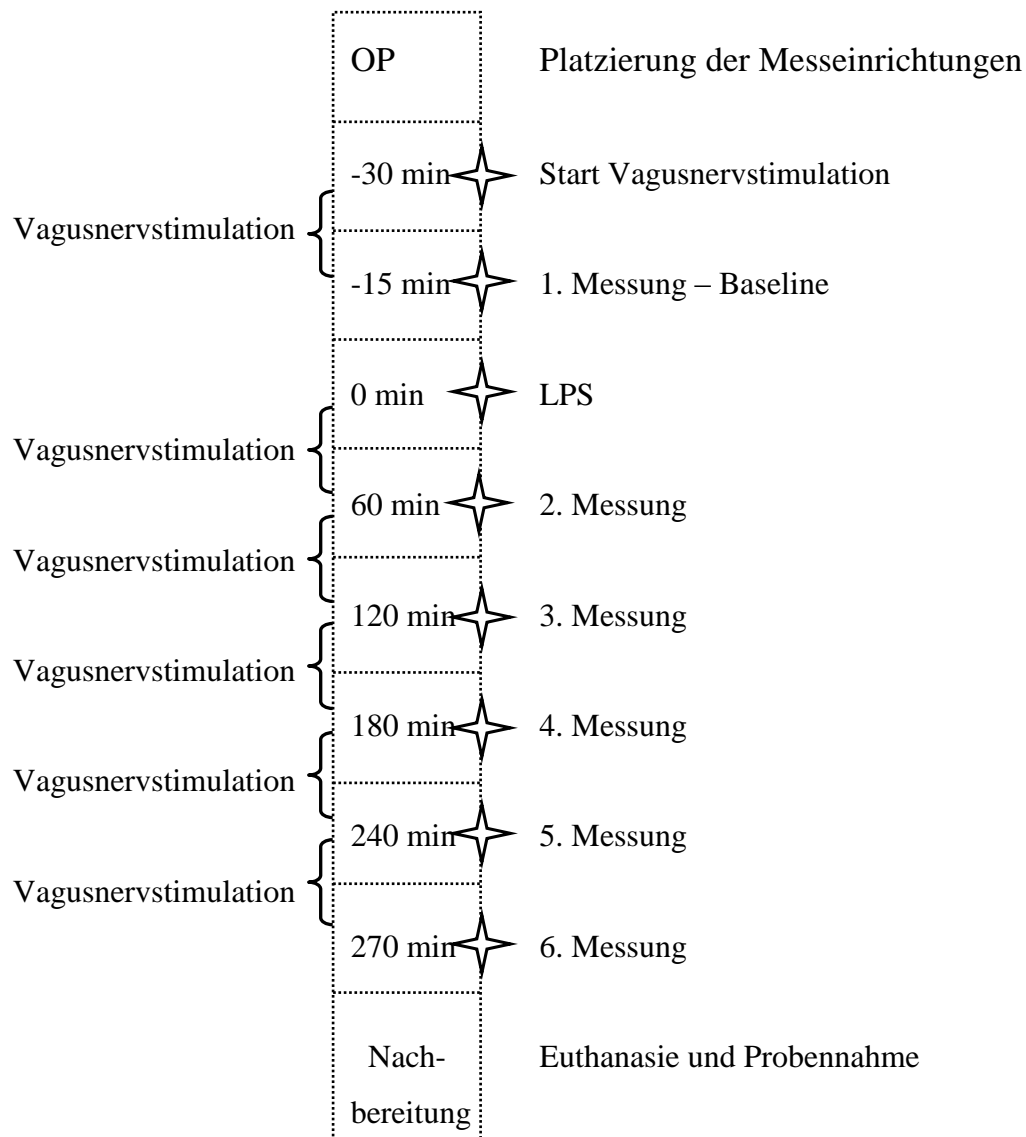


Abbildung 18: schematischer Überblick über den zeitlichen Versuchsablauf

Nach der Vorbereitungsphase, welche die Operation und die korrekte Positionierung der Messeinrichtungen beinhaltet, wurde bei den Tieren, die eine Vagusnervstimulation erhielten, 30 min vor der LPS Injektion mit dieser begonnen. Die Vagusnervstimulation wurde während der gesamten Versuchsdauer fortgeführt und nur für die Messungen der neurophysiologischen Parameter unterbrochen. Bei allen Gruppen wurde 15 min vor der LPS-Injektion eine Messung der SEPs, evozierten Flussantwort, Blutdruck, Blutglukose, Blutlaktat, Körpertemperatur und eine Blutgasanalyse durchgeführt. Mittels der dadurch gewonnenen Messwerte konnte ein interindividueller Vergleich zwischen den physiologischen Werten vor LPS Injektion

und den Werten nach LPS Injektion durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurden 5 mg/kg KG LPS intravenös appliziert.

Zur Herstellung der LPS Lösung wurden zunächst 3 mg LPS in 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung gelöst, diese Lösung wurde anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Dosis von 5 mg/kg KG entsprach bei einer Ratte mit einem durchschnittlichen Gewicht von 300 g einem Volumen von 500 μl . Um einen anaphylaktischen Schock zu vermeiden erfolgte die LPS Injektion langsam und stetig über einen Zeitraum von 5 Minuten.

Danach wurden die oben genannten Parameter stündlich erfasst. Die letzte Messung erfolgte zum Zeitpunkt $t = 270$ min. Nach Beendigung der letzten Messung wurde die finale Blutentnahme durchgeführt und daraufhin 1 ml Kaliumchlorid intravenös appliziert, wodurch ein Herzstillstand induziert wurde. Das sichere Eintreten des Todes wurde anhand der Blutdruck und EEG Parameter überprüft. Daraufhin erfolgte die Entnahme des Gehirns (siehe Kapitel I 2.7).

2.7 Probennahme und biologisches Material

Vor jeder Messung wurde über einen Dreiwegehahn mittels einer Glaskapillare etwa 20 μl Blut aus dem arteriellen Katheter gewonnen. Dieses arterielle Blut wurde für die Blutgasanalyse verwendet. Des Weiteren wurde je ein Tropfen Blut für die Messung des Blutglukose- und Blutlaktatspiegels genutzt (siehe Kapitel I 2.8).

Nach Beendigung der letzten Messung erfolgte die finale Blutabnahme, dabei wurde mit einer heparinisierten Spritze ca. 5 bis 10 ml arterielles Blut über den Dreiwegehahn aus dem Katheter entnommen. Das Blut wurde sofort bei 4°C für 15 Minuten und bei 2500 g zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C eingefroren.

Nachdem der Tod des Tieres festgestellt wurde, erfolgte die Gehirnentnahme. Das Gehirn wurde in Tissue Teck eingebettet und mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren. Dabei wurde die Probe auf ein Aluschiffchen verbracht um ein zu schnelles Abkühlen, und das damit verbundene Auftreten von Rissen im Gewebe, zu verhindern. Danach wurden die Gehirnproben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8 Blutuntersuchungen

Zu jedem Messzeitpunkt wurde mit dem arteriellen Blut eine Blutgasanalyse durchgeführt. Hierfür wurde das Blutgasanalysegerät Rapidlab™ 348 von Bayer Health Care verwendet. Die folgenden Parameter wurden dabei erfasst: arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO₂), arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO₂), pH, Hämatokrit, Elektrolyte.

Gleichzeitig wurde der Blutglukosespiegel mittels des Glucometer Elite® XL von Bayer Vital bestimmt und der Blutlaktatspiegel mittels des Gerätes Lactate Pro™ von Arkray. Die Geräte wurden entsprechend der Anweisung der Hersteller bedient.

3 Immunhistologie

3.1 Herstellung der Gefrierschnitte

Zur Herstellung der Gehirnschnitte wurde ein Kryostat der Firma Reichert-Jung verwendet, welches eine Innentemperatur von -20 bis -22 °C und eine Objekttemperatur von -18 °C bis -20 °C aufwies. Um das Gehirn zu fixieren wurde es mittels „Tissue Teck“ auf dem Objektblock aufgefroren. Danach wurden von rostral beginnend 20 µm dicke coronale Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mittels vorgekühlten, Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -60 °C aufbewahrt. Schnitte, welche für die Färbung der T-Lymphozyten verwendet werden sollten wurden für 10 min in 99,99 % Isopropanol bei -20 °C bis -22 °C fixiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Auch diese Schnitte wurden anschließend gekühlt aufbewahrt. Allerdings wurden sie innerhalb einer Woche gefärbt.

Für die Immunhistochemie wurden das *Organum subfornicale* (SFO) und der *Nucleus paraventricularis* (PVN) gesammelt. Die nicht für die Immunhistochemie verwendeten Regionen wurden ab dem *Organum vasculosum laminae terminalis* bis zur *Eminentia mediana* (Bregma 0,5 mm bis -3,5 mm; [369]; Abb. 23) übereinander auf einen Objektträger gestapelt. Danach wurde der Cortex dorsal und lateral des Hypothalamus abgeschnitten, sodass ein Anteil Cortex und ein Anteil Hypothalamus vorlag. Diese beiden Anteile wurden noch einmal jeweils halbiert und für weitere

Untersuchungen (Polymerasekettenreaktion (PCR)) aufbewahrt. Dadurch können von ein und demselben Tier mehrere Laboruntersuchungen durchgeführt werden.

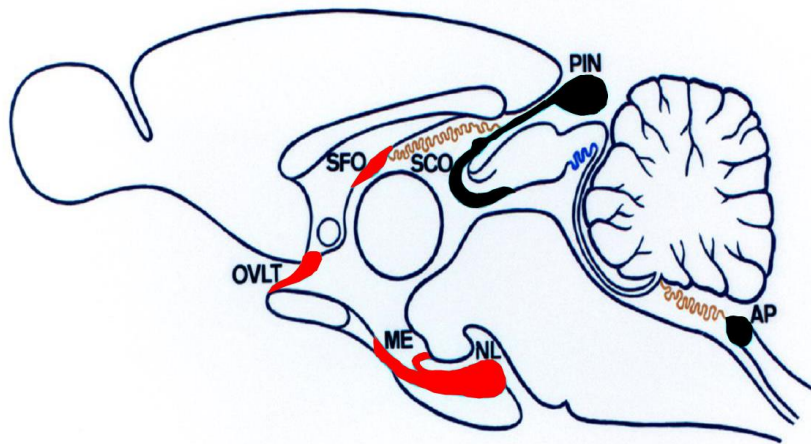


Abbildung 19: Sagittalschnitt durch das Cerebrum der Ratte

Die für die Analysen verwendeten Schnitte wurden zwischen dem rot eingezeichneten OVL und der ME gesammelt. Für die Histologischen Untersuchungen wurde das SFO verwendet.

AP: Area postrema, ME: Eminentia mediana, OVL: Organum vasculosum laminae terminalis, PIN: Glandula pinealis, SCO: Organum subcomissurale, SFO: Organum subforficale

Modifiziert nach [413]

3.2 Grundlage der Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewendet. Das Prinzip der Methode beruht auf der immunologischen Reaktion von Antikörpern mit ihrem Antigen. Im ersten Schritt bindet der primäre Antikörper ein spezifisches Epitop des Antigens, welches nachgewiesen werden soll. Im zweiten Schritt erfolgt danach die Darstellung dieses Antigen-Antikörper-Komplexes. Dafür werden sekundäre Antikörper verwendet, welche mit einem Fluorochrom gekoppelt und gegen den primären Antikörper gerichtet sind. Durch Anregung des Fluorochroms mit Licht entsprechender Wellenlänge wird dieses zur Emission längerwelligeren Fluoreszenzlichts angeregt, welches im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird [105].

Des Weiteren wurde eine Immunhistochemie (DAB-Färbung) durchgeführt. Diese unterscheidet sich von der oben genannten Immunfluoreszenz durch die Nachweisreaktion des sekundären Antikörpers. Statt eines Fluorochroms wurde hierbei ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet, der durch eine Farbreaktion mit Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) sichtbar gemacht wird. Dabei bildet DAB nach Oxidation durch die HRP am

Ort seiner Umsetzung ein braunes unlösliches Farbprodukt und zeigt dadurch die räumliche Verteilung der HRP und somit des Antigen-Antikörper-Komplexes an.

3.3 Materialien für die Immunhistochemie

Tabelle 8: Technische Geräte - Immunhistologie

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aqua bidest Anlage	Milli-Q Biocel	Millipore, Eschborn
Digitale Schwarz-weiß Kamera	Spot Insight	Diagnostic Instr. – VisiTron Systems, Puchheim
Kamera Durchlichtmikroskop	Camedia C-3030 Zoom	Olympus Optical, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX50	Olympus Optical, Hamburg
Eismaschine	Icamatic F120	CastelMAC S.p.A. Castelfranco Veneto, Italien
Kryostat	2800 Grigocut E	Reichert-Jung, Nußloch
Schüttler	Typ 3011	Roth GmbH, Karlsruhe
Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen	P1210N; AE 50 und PM 250	Mettler Toledo, Gießen
Magnetrührer	IKA - Combimag RCT	IKAR Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Tabelle 9: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien - Immunhistologie

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Fettstift	Pap-Pen	G. Kisker, Steinfurt
Inkubationskästchen mit Deckel	20 x 30 x 5 cm	Biochem Instrumente GmbH, Weilburg
Pinsel	Rotmarderhaar	Renensis, Flensburg
Pasteur-Pipetten	einweg	MAGV, Rabenau
Deckglässchen	24 x 60mm, Nr. H878	Roth GmbH, Karlsruhe
Faltenfilter 604	½ (Ø 240mm)	Schleicher und Schuell GmbH, Weilburg
Objektträger	76 x 26mm	Menzel GmbH, Braunschweig
Objektträgermappe	Für 20 Objektträger	LAT-Labor- und Analysen-Technik GmbH, Garbsen
Rasierklagen	BB522	Aesculap-Werke AG, Tuttlingen

Tabelle 10: Substanzen und Chemikalien - Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
4'-6-Diamidin-2'-Phenylindol Dilaktat (DAPI)	MoBiTec, Göttingen
Citifluor® (Glycerol in PBS-Lösung)	Cityflour LTD, London, UK
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Schmidt, Dillenburg
Immersionsöl (Refraktionsindex 1,51)	Olympus Optical, Hamburg
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Normal donkey serum (NDS)	PAA, Paschingen, Österreich
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
Triton-X-100 (t-Octylphenoxypoly-Ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
0,2M Na ₂ HPO ₄ -Lösung (Stocklösung A)	27,6g Na ₂ HPO ₄ (137,99g/mol) in 1 l Aqua bidest
0,2M NaH ₂ PO ₄ -Lösung (Stocklösung B)	35,6g NaH ₂ PO ₄ (177,9g/mol) in 1 l Aqua bidest

Material und Methoden

PBS (Phosphatpuffer), pH 7,2-7,4, 0,1M	28 % der Stocklösung A + 72 % der Stocklösung B in Aqua bidest
DAPI-Inkubationslösung	DAPI 1:8000 in PBS
Inkubationspuffer für Immunhistochemie (Block-Lösung)	10 % NDS in PBS; Zugabe von 0,1 % Triton-X-100
Paraformaldehyd-Lösung (PFA); 20 % (Stocklösung)	Ansatz von PFA in Pulverform in PBS. Lösen unter Rühren bei 65 °C, Zugabe von wenigen Tropfen 1N NaOH bis zur Klärung der Lösung; Filtration mit Faltenfilter (Ø240mm); abkühlen lassen
Paraformaldehyd-Lösung (PFA); 2 %	Ansatz aus PFA-Stocklösung in PBS (1:10)

Tabelle 11: Substanzen und Chemikalien – DAB-Färbung

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
Tris base	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Tris buffered saline (TBS)	60,5 g Tris base, 90 g NaCl, 50 ml 25 % HCl auf 1000 ml H ₂ O auffüllen
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS)	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,24 g Na ₂ HPO ₄ , 2 g KH ₂ PO ₄ , 8 ml 1 N HCl auf 10 Liter auffüllen
Normal rat serum (NRS)	Harlan Laboratories B.V., 5961 NM Horst, Niederlande, Referenznummer: AP/12-000281 Hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min
3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Tetrahydrochlorid Tablets	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Produktnummer: D 5905
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Natriumjodat (NaIO ₃)	Merck, Darmstadt
Kalialaun	Merck, Darmstadt
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalan	1,0 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kalialaun in 1000 ml H ₂ O lösen. Über Nacht stehen lassen. 50 g Chloralhydrat, 1,0 g Zitronensäure zugeben, ca. 30 min unter rühren erhitzen, abkühlen lassen und filtrieren
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Albumin bovine Fraction V (Bovines Serum Albumin BSA), pH 7,0,	Serra Elektrophoresis GmbH, Heidelberg Lot: 130184
Natriumhypochloridlösung (NaClO) 12 % Chlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol ≥ 99,8 %	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pertex	Medite GmbH, Burgdorf, Lot: 179047
Inkubationslösung für den primären Antikörper	0,1 % Natriumazid, 1 % BSA, 10 % NRS in PBS
Inkubationslösung für den sekundären Antikörper	5 % BSA in PBS

3.4 Antikörper

3.4.1 Primäre Antikörper

Zur Detektion neutrophiler Granulozyten, ICAM-1 und NF-IL 6 wurden die in Tabelle 12: Primäre Antikörper - Immunhisto aufgeführten Antikörper verwendet. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde im Versuch bestätigt oder in früheren Untersuchungen nachgewiesen [112].

Für den Nachweis von T-Lymphozyten wurde ein in der Maus gebildeter Antikörper verwendet, der sich gegen eine Region der Beta-Kette von alpha/beta T-Zell Rezeptoren der Ratte richtet. Um ein optimales Färbeergebnis zu erzielen wurden verschiedene Modalitäten überprüft. Zunächst wurde der Antikörper auf Schnitten der Milz getestet, wobei sich die typische Färbung und Verteilung der Milzlymphozyten zeigte. Als nächstes wurde die Qualität der Färbung an den Gehirnschnitten überprüft. Dabei wurde zunächst das Vorkommen endogener Pigmente ausgeschlossen, indem die Schnitte außer der Hämalanfärbung keine Behandlung erfuhren. Während der üblichen Inkubationszeiten wurden die Schnitte in PBS gelagert. Im nächsten Ansatz wurde die Inaktivierung der endogenen Peroxidase überprüft, indem nur die Inkubation mit H₂O₂ und DAB erfolgte. Als nächstes wurde das unten angegeben Protokoll verwendet, jedoch ohne Inkubation mit dem primären Antikörper. Dadurch wurde sichergestellt, dass durch den sekundären Antikörper keine Artefakte entstanden. Schlussendlich erfolgte die Färbung unter Zugabe von 10 % NRS zum primären Antikörper um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Unter Verwendung dieses Protokolls traten keine unspezifischen Signale auf.

Tabelle 12: Primäre Antikörper - Immunhistologie

Antigen	Spezies, Typ	Verdünnung in Blocklsg.	Triton-X Anteil	Katalognummer, Hersteller
MPO	Rabbit polyclonal IgG	1:400 / 1:700	0,1 %	A 0398, Dako Deutschland GmbH, Hamburg
ICAM-1	Goat polyclonal IgG	1:1000	0,1 %	AF583 / R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
NF-IL6	Goat polyclonal IgG	1:250	0,1 %	Sc-150-G; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
R73	Mouse monoclonal IgG	1:500	0 %	MCA453G / AbD Serotec, Kidlington, UK

3.4.2 Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper wurden bei der Immunfluoreszenz fluorochromgekoppelte Antikörper mit einem Excitationsmaximum von 495 nm bzw. 550 nm in einer Verdünnung von 1:500 bzw. 1:600 verwendet.

Für den Nachweis der T-Lymphozyten wurde ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper in einer Verdünnung von 1:70 verwendet.

Tabelle 13: Sekundäre Antikörper - Immunhistologie

Antikörper	Tierart	Verdünnung	Katalognummer , Hersteller
Alexa Fluor® 488	Donkey anti rabbit	1:500	AZA21206, MoBiTec GmbH, Göttingen
Cy TM 3	Donkey anti goat	1:600	705-165-147, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
HRP gekoppelt	Rabbit anti mouse	1:70	P0161, Dako Deutschland GmbH, Hamburg

3.4.3 Kernfärbungen – Gegenfärbung

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit und Unterscheidung von intra- und perinukleären Signalen wurde bei der Immunfluoreszenz eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Dabei werden durch die unspezifische Bindung von DAPI an DNA alle Zellkerne angefärbt.

Bei der Färbung der T-Lymphozyten wurde zur Gegenfärbung eine Hämalaunfärbung durchgeführt.

3.5 Arbeitsprotokoll

3.5.1 Immunfluoreszenz

Die Färbung erfolgte nach dem unten angegebenen Protokoll.

Dabei diente die Fixierung mittels PFA dem Schutz des Antigens während der Prozessierung. Danach wurde mittels der Block-Lösung, welche 10 % NDS und 0,1 % Triton X-100 enthielt, eine Sättigung unspezifischer Bindungsstellen erreicht. Die Antikörper wurden vor der Inkubation in der Blocklösung verdünnt. Sobald der sekundäre Antikörper verwendet wurde, erfolgte die weitere Bearbeitung unter möglichst lichtarmen Bedingungen. Deshalb wurden die Proben nach dem Deckeln in eine lichtundurchlässige Mappe verbracht und bei 4 °C gelagert. Da die Signalstärke

mit der Zeit abnimmt wurden alle Schnitte noch am selben Tag unter dem Mikroskop analysiert und fotografiert.

Tabelle 14: Protokoll - Immunfluoreszenz

Schritt	Durchführung / Reagenz	Temperatur	Dauer
Schnitte aufwärmen		-20 °C	10 min
trocknen	Mit Fettstift umranden, beschriften	RT (Raumtemp.)	5-7 min
Fixierung	PFA 2 %	RT	10 min
waschen	PBS	RT	3 x 5 min
Blocken	In feuchter Kammer, mit Blocklösung	RT	60 min
Inkubation: Primärantikörper	In feuchter Kammer, ca. 300 µl pro Schnitt	4 °C	Über Nacht (20-24 h)
Schnitte aufwärmen		RT	10 min
waschen	PBS	RT	3 x 5 min
Inkubation: Sekundärantikörper	In feuchter Kammer, abgedunkelt ca. 300 µl pro Schnitt	RT	120 min
waschen	PBS, abgedunkelt	RT	3 x 5 min
DAPI-Kernfärbung	DAPI, abgedunkelt	RT	10 min
waschen	PBS, abgedunkelt	RT	3 x 5 min
deckeln	Citifluor, abgedunkelt	RT, danach Lagerung bei 4 °C	

3.5.2 DAB-Färbung

Für die DAB-Färbung erfolgte die Fixierung bereits direkt nach der Herstellung der Gefrierschnitte, weshalb sie in Kapitel I 3.1 beschrieben ist. Bei dieser Färbung bewirken Peroxidasen eine Umsetzung des DAB zu einem braunen Präzipitat, welches das Vorkommen und die Lokalisation der Peroxidasen anzeigt. In einigen Zellen (unter anderem Erythrozyten, Myozyten, Granulozyten, Monozyten) existieren jedoch auch endogene Peroxidasen, die ein falsch positives Ergebnis induzieren können. Um sicherzustellen, dass die Peroxidase ausschließlich durch das Detektorsystem zugeführt wurde, erfolgte zunächst eine Inaktivierung endogener Peroxidasen durch die Inkubation in 1 % H₂O₂. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper, welche in der jeweiligen Inkubationslösung (siehe Tabelle 11) verdünnt wurden, gefolgt von der Zugabe des DABs, das daraufhin von der HRP umgesetzt wurde. Schließlich folgte eine Hämalaun-Färbung.

Da die DAB-Färbung nicht lichtempfindlich ist, konnten die Schnitte unbedenklich bei Raumtemperatur gelagert und beliebig oft betrachtet werden. Die Färbung erfolgte nach dem unten angegebenen Protokoll.

Tabelle 15: Protokoll – DAB-Färbung

Schritt	Durchführung / Reagenz	Temperatur	Dauer
Überführen der Schnitte	in PBS	RT	
Inaktivierung endogener Peroxidasen	H ₂ O ₂ 1 % in PBS	In Eiswasser, 4 °C	30 min
waschen	PBS	RT	3 x 2 min
Inkubation: Primärantikörper	In feuchter Kammer, ca. 300 µl pro Schnitt	RT	60 min
waschen	PBS, abspülen mit Pasteurpipette	RT	3x
Inkubation: Sekundärantikörper	In feuchter Kammer, ca. 300 µl pro Schnitt	RT	60 min
waschen	TBS, abspülen mit Pasteurpipette	RT	3x
Aktivierung von DAB	H ₂ O ₂	RT	
Farbreaktion	Aktiviertes DAB, ca. 500 µl pro Schnitt	RT	10 min
waschen	PBS, abspülen mit Pasteurpipette	RT	3x
Hämalaunfärbung	Doppelt destilliertes Wasser	RT	Ca. 3 sek.
	1:5 verdünntes Hämalaun	RT	1,5 min
	Doppelt destilliertes Wasser	RT	Ca. 3 sek.
	Leitungswasser	RT	5 min
Entwässerung	Doppelt destilliertes Wasser	RT	Ca. 3 sek.
	Aufsteigende Alkoholreihe: 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 % Ethanol	RT	Je 3 min
	2 mal Xylol	RT	je 3 min
Deckeln, aushärten	Pertex	RT	

3.6 Mikroskopie

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie wird das Licht zunächst in einer Quecksilberdampflampe gebildet und dann durch verschiedene Filter geleitet, sodass die Wellenlängen des Excitationsmaximums der einzelnen Fluochrome entstehen. Daraufhin emittieren sie Licht einer spezifischen Wellenlänge, welches für das menschliche Auge farbig erscheint. In der unten stehenden Tabelle sind die verwendeten Fluochrome mit ihren Wellenlängen und emittierten Farben aufgeführt.

Tabelle 16: Wellenlängen

Filter	Fluochrom	Excitationwellenlänge	Emmissionswellenlänge	Farbe
U-MWIBA	Alexa 488®	460 – 490 nm	510 -540 nm	grün
U-MWU	Cy3™	330 – 385 nm	630 – 660 nm	rot
U-MNG	DAPI	358 nm	461 nm	blau

Die Immunfluoreszenz Schnitte wurden direkt nach der Färbung am Mikroskop beurteilt und in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert. Dabei wurden mittels einer Schwarz-weiß Kamera Bilder der drei einzelnen Farbkanäle aufgenommen, welche danach entweder einzeln ausgewertet oder mit Hilfe des Metamorph Programms zu einem dreifarbigem Bild zusammengefügt wurden. Um eine

Vergleichbarkeit zwischen den Fotos zu gewährleisten, wurde bei allen Schnitten einer Färbung die gleichen Belichtungszeiten verwendet.

Die DAB gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.7 Quantifizierung der Ergebnisse

Es wurden 5 Tiere pro Gruppe und 3 Schnitte pro Tier analysiert. Für die Berechnung wurden aus den Mittelwerten jedes Tieres die Mittelwerte der entsprechenden Gruppe gebildet („mean of the mean“).

Die Analysen wurden im Cortex links und rechts der Mittellinie, sowie im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* durchgeführt.

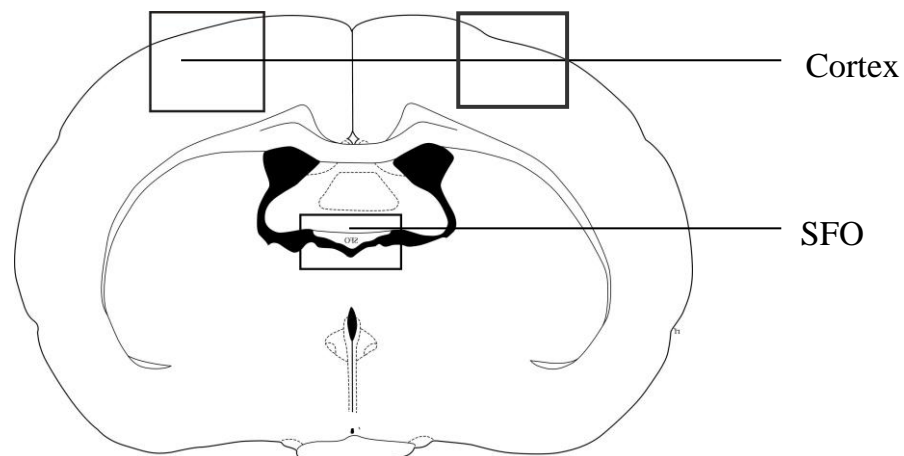


Abbildung 20: Schematische Darstellung eines coronalen Schnitts durch das Gehirn der Ratte

Die Kästen markieren die Bereiche des Cortex und des *Organum subfornicale* (SFO), die für die Auswertung verwendet wurden. Modifiziert nach Paxinos & Watson (1998)

3.7.1 Neutrophile Granulozyten

Die Anzahl neutrophiler Granulozyten wurde jeweils aus einem Bild des Cortex links und rechts der Mittellinie bei 5-facher Vergrößerung, (entspricht ca. 6 mm² pro Gesichtsfeld), sowie einem Bild des SFO und des angrenzenden *Plexus choroideus* bei 10-facher Vergrößerung (entspricht ca. 1,8 mm² pro Gesichtsfeld) ermittelt. Für eine verbesserte Auswertung wurden die Bilder in Helligkeit und Kontrast mittels Photoshop® angepasst. Für die weitere Auswertung wurde das Programm FIJI verwendet. Damit wurde zunächst ein Medianfilter angewandt, welcher das Bildrauschen verbessert und danach ein Threshold gesetzt. Des Weiteren wurde die Watershed Funktion genutzt, die zwei Signale, welche aufgrund räumlicher Nähe zu

einem Signal verschmelzen, erkennt und trennt. Anschließend wurde eine automatisierte Zählung aller Partikel über 20 Pixel durchgeführt. Alle Bilder wurden nach dem gleichen Regime bearbeitet, sodass die Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

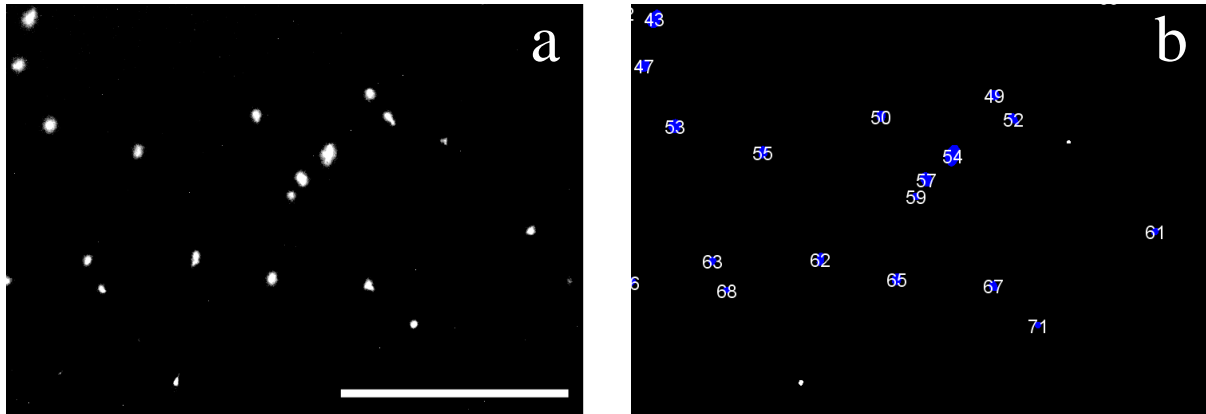


Abbildung 21: Automatisierte Quantifizierung neutrophiler Granulozyten am Beispiel eines Bildausschnitts aus dem Cortex, aufgenommen bei 5-facher Vergrößerung.

Bild a zeigt einen Ausschnitt des Originalbilds, welches zur Erleichterung der Auswertung in schwarz-weiß dargestellt ist. Die weißen Punkte indizieren neutrophile Granulozyten. Bild b zeigt das Ergebnis der automatisierten Zählung nach Anpassung von Helligkeit und Kontrast, Verwendung eines Medianfilters und setzen eines Thresholds. Dabei werden die gezählten Signale nummeriert und das Gesamtergebnis angezeigt.

Der in Bild a dargestellte Größenmarker entspricht 50 μm und gilt für die Bilder a und b.

3.7.2 ICAM-1

Für die Auswertung der ICAM-1 Signale wurden die gleichen Arbeitsschritte wie für die Zählung der neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Allerdings wurde hierbei nicht die Anzahl der gezählten Partikel als Ergebnis verwendet, sondern der prozentuale Anteil der gefärbten Bereiche am Gesamtschnitt. Es wurden ebenfalls Bilder aus dem Bereich des Cortex, sowie des SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* verwendet, jedoch bei 20-facher Vergrößerung (entspricht ca. 0,448mm²).

Für ICAM-1 wurde während der Mikroskopie zusätzlich eine semiquantitative Quantifikation durchgeführt, welche die Ergebnisse der automatisierten Zählung verifizierte. Dabei wurden 7 Stufen unterschieden, wobei – für keine sichtbaren Signale und +++ für eine maximale Signalausprägung stand.

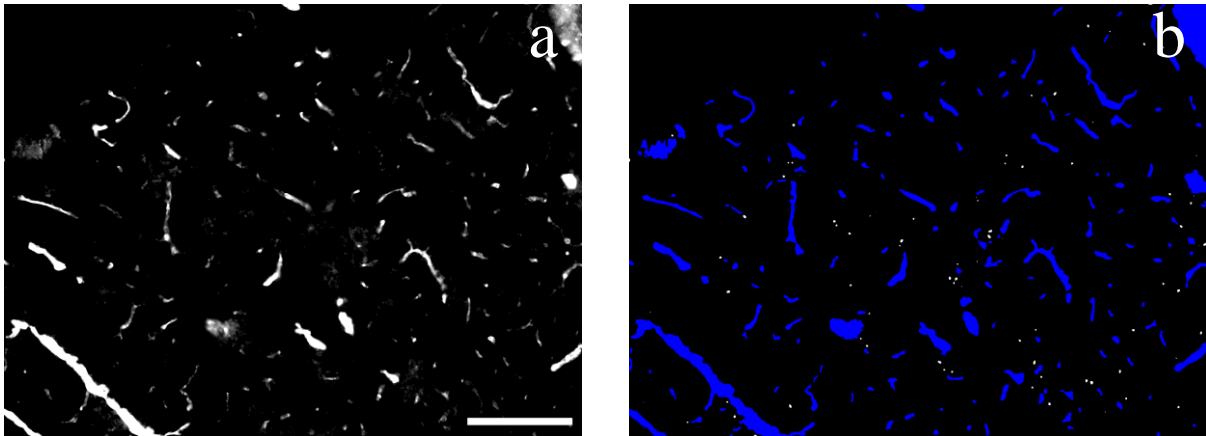


Abbildung 22: Automatisierte Quantifizierung des ICAM-1 Signals am Beispiel eines Bilds aus dem Cortex bei 20-facher Vergrößerung.

Bild a zeigt einen Ausschnitt des Originalbilds, welches zur Erleichterung der Auswertung in schwarz-weiß dargestellt ist. Die weiß gefärbten Bereiche indizieren die ICAM-1 Signale.

Bild b zeigt das Ergebnis der automatisierten Zählung nach Anpassung von Helligkeit und Kontrast, Verwendung eines Medianfilters und setzen eines Thresholds. Bei dieser Auswertung wurde der prozentuale Anteil des gefärbten Bereichs am Gesamtschnitt zur Quantifizierung herangezogen.

Der im Bild a dargestellte Größenmarker entspricht 100 μm und gilt für die Bilder a und b.

3.7.3 Kolokalisation neutrophiler Granulozyten und ICAM-1

Um die Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit ICAM-1 zu untersuchen, wurde die Kolokalisation der beiden Signale betrachtet. Hierfür wurden die beiden entsprechenden Kanäle zu einem Farbbild zusammengesetzt und es erfolgte ebenfalls eine Helligkeits- und Kontrastanpassung mittels Photoshop®. Danach wurden mit Hilfe der manuellen Zählfunktion des FIJI Programms zunächst alle grünen Signale der neutrophilen Granulozyten markiert und anschließend in der Überlagerung mit dem roten ICAM-1 Kanal zusätzlich alle neutrophilen Granulozyten markiert, welche sich mit dem ICAM-1 Signal überlagerten. Es wurde nun der prozentuale Anteil mit ICAM-1 kolokalisierter neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten des Schnittes berechnet. Für die Auswertung wurden Schnitte des Cortex links und rechts der Mittellinie bei 10-facher Vergrößerung verwendet (entspricht ca. $1,8\text{mm}^2$ pro Gesichtsfeld). Um subjektive Einflüsse zu minimieren erfolgte die Auswertung verblindet.

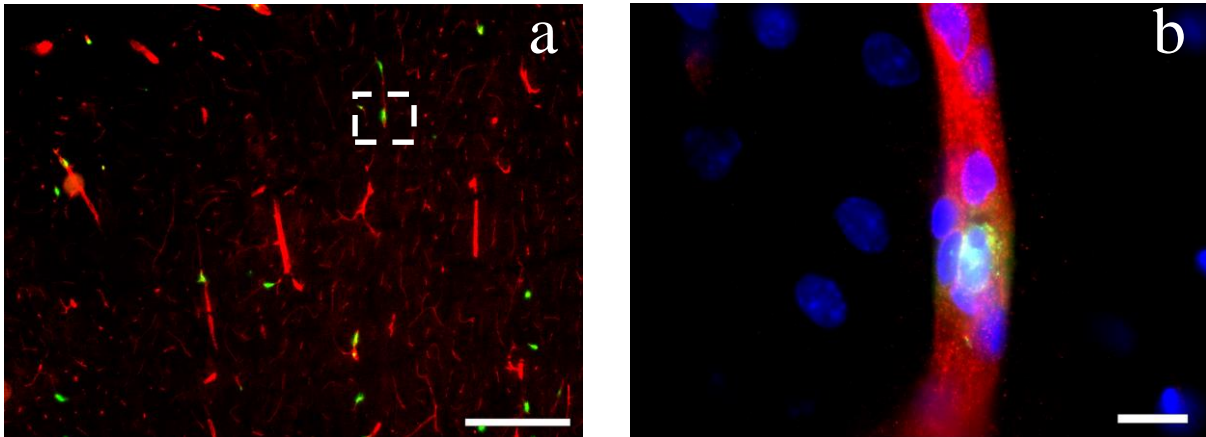


Abbildung 23: beispielhafte Darstellung der Kolo-kalisation von ICAM-1 und neutrophilen Granulozyten.

Bild a ist beispielhaft für die zur Auswertung verwendeten Bilder. Die Aufnahme zeigt ICAM-1 Signale (rot) und neutrophile Granulozyten (grün), welche teilweise kolo-kalisiert sind.

Bild b stellt eine Detailaufnahme aus Bild a dar und zeigt einen neutrophilen Granulozyten in einem ICAM-1 positiven Gefäß (rot). Typisch für neutrophile Granulozyten ist der segmentierte Kern (blau) und die Myeloperoxidase Immunreaktivität (grün).

Der Größenmarker in Bild a entspricht 200 μm , der Größenmarker in b 10 μm .

3.7.4 NF-IL6

Die NF-IL6 Signale wurden ebenfalls zunächst semiquantitativ mit der oben genannten 7 stufigen Skala beurteilt und anschließend eine Zählung anhand der Bilder durchgeführt. Dabei wurden zunächst im blauen Kanal sämtliche Zellkerne markiert. Nach Überlagerung mit dem roten Kanal wurden alle NF-IL6 positiven Zellkerne doppelt markiert, wobei überprüft wurde, ob es sich tatsächlich um nukleäre Signale handelte. Es wurde nun der prozentuale Anteil NF-IL6 positiver Zellkerne an der Gesamtzahl der Zellkerne des Schnittes berechnet. Zur Auswertung wurden Bilder des Übergangs von SFO zu *Plexus choroideus* bei 100-facher Vergrößerung verwendet. Um subjektive Einflüsse zu minimieren erfolgte die Auswertung verblindet.

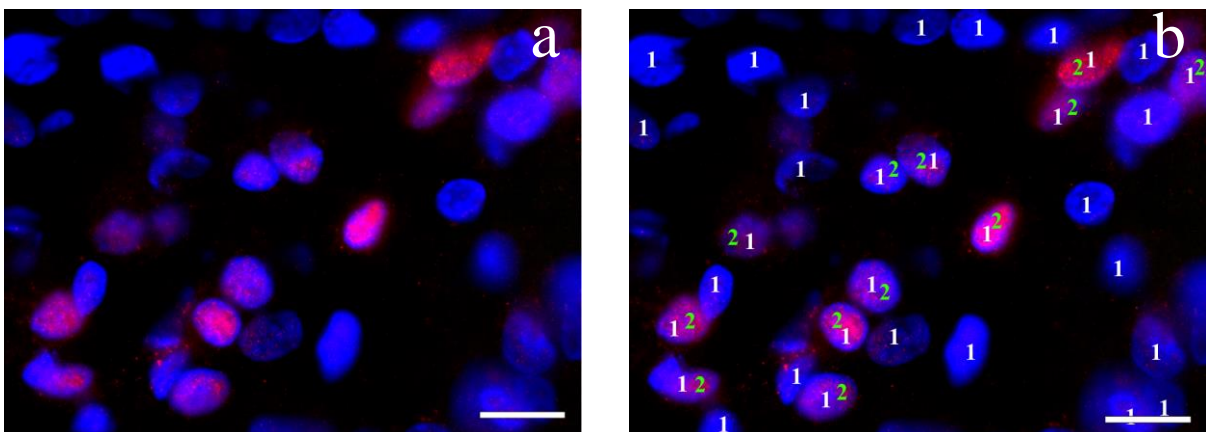


Abbildung 24: Quantifizierung NF-IL6 positiver Zellen am Beispiel eines Bildausschnitts aus dem Bereich des SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* bei 100-facher Vergrößerung.

Bild a zeigt Zellkerne (blau), von denen einige NF-IL6 positiv sind (rot). Zur Quantifizierung in Bild b wurden zunächst unter Betrachtung des blauen Kanals alle Zellkerne mit der Zahl 1 (weiß) markiert. Anschließend erfolgte eine Überlagerung mit dem roten Kanal, die es ermöglichte alle NF-IL6 positiven Zellkerne zusätzlich mit der Zahl 2 (hellgrün) zu markieren.

Der Größenmarker in Bild a und b entspricht 10 μm .

3.7.5 T-Lymphozyten

Bei den Schnitten der DAB-Färbung wurde die T-Lymphozytenanzahl während der Lichtmikroskopie quantitativ ermittelt. Dafür wurde bei 10-facher Vergrößerung jeweils ein Raster im Cortex rechts und links der Mittellinie und im Bereich des Interhemisphärenspalts bei 10-facher Vergrößerung (entspricht jeweils ca. 1mm^2), sowie 2 Raster im Bereich des SFO und *Plexus choroideus* bei 20-facher Vergrößerung (entspricht ca. $0,5\text{mm}^2$) ausgezählt.

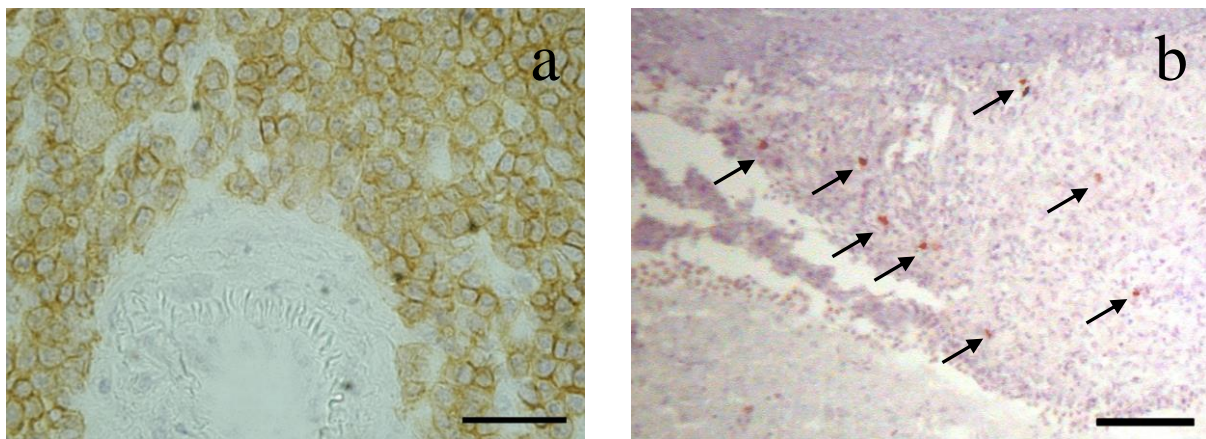


Abbildung 25: Beispielhafte Darstellung von T-Lymphozyten

Bild a zeigt einen Ausschnitt aus der Milz, in dem die T-Lymphozyten (braun) eine typische Anordnung um ein Gefäß zeigen.

Bild b zeigt einen Ausschnitt des *Organum subformicale* (SFO) und angrenzenden *Plexus choroideus* mit vereinzelt T-Lymphozyten (Pfeile).

Der Größenmarker in Bild a entspricht 25 μm und der Größenmarker in Bild b entspricht 100 μm .

4 PCR

4.1 Grundlage der Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde eine „Two-step relative quantitative reverse transcriptase PCR“ (qRT-PCR) durchgeführt. Voraussetzung hierfür ist zunächst die Extraktion von RNA aus den Gewebeproben. Daraufhin erfolgte die reverse Transkription um entsprechende doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA)

Vorlagen („Templates“) herzustellen. Schließlich erfolgte mit einem Teil der gewonnenen DNA die quantitative real time PCR, während der Rest für weitere Analysen aufbewahrt wurde.

Grundsätzlich setzt sich die PCR aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation zusammen. [336] Bei der Denaturierung wird doppelsträngige DNA bei hohen Temperaturen von 95 °C zu einsträngiger DNA „geschmolzen“ und Sekundärstrukturen gelöst. Während des folgenden Annealings (Hybridisierung) erfolgt die Bindung der Primer an ihre komplementären Sequenzen bei moderaten Temperaturen von 60 °C. Schließlich erfolgt in der Elongationsphase, ausgehend von den Primern, die Verlängerung des doppelsträngigen DNA (dsDNA) Amplifikats mit Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) durch die *Taq-Polymerase*, sodass eine Kopie des ursprünglichen Templates entsteht.

Da diese Vorgänge an beiden Einzelsträngen des ursprünglich doppelsträngigen Templates ablaufen, erfolgt mit jedem Zyklus eine Verdoppelung der DNA-Templates. Deshalb zeigt die Reaktionskinetik zunächst nach überschreiten der Hintergrundfluoreszenz („Baseline“) eine exponentielle Zunahme der Amplifikate pro Zyklus (Exponentialphase). Im weiteren Verlauf sinkt die Menge an intakten Primern und dNTPs und es kann zur kompetitiven Bindung der Amplifikate untereinander kommen, sodass die Reaktionskinetik in einen linearen Verlauf übergeht und schließlich in der Plateauphase stagniert.

Bei der qRT-PCR wird nicht nur das Template amplifiziert, es erfolgt im gleichen Schritt die Quantifizierung der entstandenen Amplifikate. Hierfür wird neben dem Primer eine für die nachzuweisende DNA spezifische Sonde verwendet. Diese Sonde ist an zwei Flouochrome mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen gekoppelt, welche Donor („Reporter“) und Akzeptor („Quencher“) genannt werden. Liegen Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe zueinander erfolgt nach Anregung des Donors eine strahlungsfreie Übertragung der Energie auf den Akzeptor im Rahmen des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) [90]. Dadurch wird die Emission von Licht durch den Donor unterdrückt. Bei der Elongation wird nun durch die 5'Nuclease Aktivität der *Taq-Polymerase* ein Teil der Sonde mit dem Donor abgespalten. Dadurch wird die räumliche Nähe von Donor und Akzeptor aufgehoben und die Lichtemission des Donors wird nicht länger

unterbunden. Da die nun auftretende Lichtemission proportional zur Amplifikation des Templates ansteigt, kann sie zur Quantifizierung herangezogen werden [208].

4.2 Materialien für die PCR

Tabelle 17: Technische Geräte - PCR

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Autoklav	Typ: Systec 2540 EL	Systec, Wettenberg
Homogenisator	SONOPULS	Bandelin Electronoc GmbH & Co KG, Berlin
Minishaker/Vortex	MS1	IKA Works Inc. Wilmington, NC, USA
Spectrophotometer	DU®50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System		Applied Biosystems, Foster City, CA USA
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Thermo Scientific Waltham, MA, USA
Zentrifuge	Spectrafuge mini	Neo Lab Heidelberg
Zentrifuge für 96well Platten	PerfectSpinP	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tabelle 18: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien - PCR

Bezeichnung	Hersteller
MicroAMP™ 96-Well Support Base	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA / Life technologies
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate 0.1ml	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA / Life technologies
Mikro Küvette (45mm x 12,5mm x 12,5mm; Schichtdicke 10mm) aus Quarzglas Suprasil®	Hellma Analytics, Mühlheim
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA / Life technologies
Optical Flat Cap 8 / strip	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA / Life technologies

Tabelle 19: Substanzen und Chemikalien - PCR

Arbeitsschritt	Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
RNA-Extraktion	Trizol	Thermo Fisher Scientific / Life technologies, Carlsbad, CA, USA
	Chloroform	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
	Ethanol 100 % (unvergällt)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
	DEPC H ₂ O	0,1 % DEPC in Aqua bidest., 24 Stunden rühren bei RT, anschließend autoklavieren
	RNase Zap®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Reverse Transkription	5 x First Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3, bei RT) 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific / Life technologies, Carlsbad, CA, USA
	Desoxynukleotide (dNTP) Mix; 10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
	Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	Thermo Fisher Scientific / Life technologies, Carlsbad, CA, USA
	Moloney murine leukemia virus	Thermo Fisher Scientific / Life

	(M-MLV) Reverse Transcriptase; 200 I.E./µl	technologies, Carlsbad, CA, USA
	Random Hexamers (Random primers); 50µM in 10 mM Tris-HCl; pH 8,3	Thermo Fisher Scientific / Life technologies, Carlsbad, CA, USA
RT-PCR	TaqMan® Gene Expression Master Mix Katalognr.: 4369016, LOT: BLEIWIJK,NL	Thermo Fisher Scientific / Life technologies, Carlsbad, CA, USA
	Autoklaviertes Wasser	
Bestimmung des Referenzgens	Master Mix	Primer Design Ltd, Southamptonm UK

Tabelle 20: Primer – PCR

TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems / Life technologies, Carlsbad, CA, USA)

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments//cms_085696.pdf

Gen	Assay ID, LOT
β-Aktin (Referenzgen)	4352340E, Rat ACTB Endogenous Control (VIC/MGB Probe, Primer Limited)
ICAM-1	Rn00564227_m1
NF-IL6	Rn00824635_s1, LOT: P110928-004 C07
IκBα	Rn01473658_g1, LOT: P141120-002 H03
SOCS3	Rn00585674_s1, LOT: 1074580
IL-1β	Rn00580432_m1
IL-6	Rn01410330_m1, LOT: 1024193
IL-10	Rn99999012_m1, LOT: 892867
IL-17	Rn01757168, LOT: P110428-002 P09
TNFα	Rn99999017_m1, LOT: 1342460
Neutrophilen Elastase (Elane)	Rn01535456_g1, LOT: P130327-006 A10
CD168	Rn01495634, LOT: 1058227
CXCL1	Rn00578225_m1, LOT: 728675
COX2	Rn00568225_m1
mPGES1	Rn00572047ml, LOT; 1305227

Tabelle 21: Primer für den Test der Referenzgene - PCR

Double-dye (Hydrolysis) probe geNorm 6 gene kit, ge-DD-6, Primer Design Ltd, Southamptonm UK

Gen	Assay ID, LOT
GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)	ge-DD-6, 25908
β-Aktin	ge-DD-6, 24025
UBC	ge-DD-6, 25908
18S	ge-DD-6, 25908
Canx	ge-DD-6, JN110253
B2M	ge-DD-6, 25908

4.3 RNA Extraktion

Vor Beginn des Prozederes wurden zunächst sämtliche Flächen und Gebrauchsgegenstände mit 70 % Ethanol und RNase ZAP® gereinigt, um eine Kontamination mit RNasen, welche zu einem Abbau der RNA führen, zu verhindern. Aus demselben Grund wurde DEPC-Wasser bzw. autoklaviertes Wasser verwendet.

Für die Probengewinnung und -lagerung siehe Kapitel I 3.1. Es wurde zum einen RNA aus dem Cortex und angrenzendem Hippocampus, zum anderen aus dem Hypothalamus gewonnen. Das Material stammte von den Tieren, die zuvor für die Immunhistologie verwendet wurden. Die Gruppengröße betrug somit ebenfalls $n = 5$ Tiere.

Bei der RNA-Extraktion erfolgte zunächst eine mechanische Zerkleinerung der Proben mit Hilfe von Ultraschall. Zusätzlich führte die Zugabe von Trizol zur Zerstörung der Zellintegrität, Inaktivierung endogener RNasen und dem Aufschluss von Nukleoproteinkomplexen. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt und die Gewinnung des entstehenden Überstandes wurden Stoffe mit hohem Molekulargewicht, Polysaccharide und Fette abgetrennt. Anschließend wurden denaturierte Proteine und DNA durch Chloroform gelöst und bei der folgenden Zentrifugation in der unteren organischen Phase abgeschieden, während sich die RNA in der oberen wässrigen Phase sammelte. Nach Gewinnung des RNA-haltigen Überstands erfolgte eine Ausfällung der RNA durch Isopropanol. Dies ermöglichte nach erneuter Zentrifugation die Bildung eines RNA-Pellets. Danach wurden Isopropanol- und Ethanolreste durch die folgenden Wasch- und Trocknungsschritte entfernt und das RNA-Pellet in DEPC-Wasser gelöst [333]. Anschließend erfolgte eine photometrische Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der gewonnenen RNA. Dafür wurde zunächst die optische Dichte (OD) der RNA-Lösung bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 (bei pH 7) einer Konzentration von 40 $\mu\text{g RNA/ml}$. Daraus folgt, dass die RNA-Konzentration wie folgt berechnet werden kann:

$$\text{RNA-Konzentration der Messlösung } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{RNA-Konzentration der Probe } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung}$$

Für die nachfolgende reverse Transkription wurden die Proben mittels DEPC-Wasser auf eine RNA-Konzentration von 250 $\text{ng}/\mu\text{l}$ standardisiert.

Zur Überprüfung des Reinheitsgrads wurde zusätzlich die OD_{280} gemessen und die Ratio zwischen OD_{260} und OD_{280} bestimmt. Dabei entsprechen Werte von 1,9-2,1 reiner RNA während Werte $< 1,6$ Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolen anzeigen.

Tabelle 22: Protokoll – RNA Extraktion

Schritt	Durchführung / Reagenz	Temp.	Dauer
Homogenisierung	Zugabe von 1000 µl Trizol (Proben > 50 mg), Homogenisierung mittels Sonicater (Amplitude 40 %)	4 °C	15 sek.
Reinigung des Ultraschallkopfes	Spülen mit Ethanol 70 %, DEPC H ₂ O		Je ca. 5 sek.
Zentrifugation	1200 rpm	4 °C	10 min
Gewinnung des Überstand 1	Überstand in neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführen	4 °C	
Trennung von Nucleoproteinen	Stehen lassen	RT	5 min
Zugabe von Chloroform	200 µl Chloroform pro 1000 µl Trizol, kräftig schütteln	4 °C	15 sek. schütteln
Separation	Stehen lassen	RT	3 min
Zentrifugation	1200 rpm	4 °C	20 min
Gewinnung des Überstand 2	Klare Phase in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl (pro 1000 µl Trizol) Isopropanol pipettieren	4 °C	
mischen	vortexen		10 sek.
Ausfällen		-20 °C	Über Nacht
Zentrifugation	1500 rpm	4 °C	15 min
Pellet waschen	Überstand verwerfen, 1 ml Ethanol 70 % dazugeben	4 °C	
mischen	Vortexen bis das Pellet aufschwimmt		
Zentrifugation	1500 rpm	4 °C	10 min
Pellet waschen	Überstand verwerfen, 1 ml Ethanol 100 % dazugeben	4 °C	
mischen	vortexen bis das Pellet aufschwimmt		
zenrifugieren	1500 rpm	4 °C	10 min
trocknen	Überstand verwerfen		20-25 min
Pellet lösen	In 50 µl DEPC Wasser		
Herstellung der Messlösung für Konzentrationsmessung	Je nach Konzentration 1:50 bis 1:80 in autoklaviertem Wasser		
Konzentrationsmessung	Messung bei 260 und 280 nm, Quarzküvette		
Einstellen auf Endkonzentration	250 ng/ml in DEPC-Wasser		

4.4 Reverse Transkription

Im Anschluss an die RNA-Extraktion wurde zur Gewinnung von cDNA eine reverse Transkription durchgeführt. Dabei wurde die mRNA durch eine RNA-abhängige DNA Polymerase (reverse Transkriptase) unter Anlagerung von Desoxynukleotiden (dNTP) in eine doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Als Primer dienten zufällige Hexamere (random Hexamer). Folgende Blanks wurden zum Ausschluss möglicher Kontaminationen der Lösungen mitgeführt:

Blank 1: Mix 1 + DEPC-Wasser statt der RNA-Lösung

Blank 2: Mix 2 + DEPC-Wasser statt Mix 1 und RNA-Lösung

Tabelle 23: Protokoll – reverse Transkription

Schritt	Durchführung / Reagenz	Temperatur	Dauer
Herstellung Mix 1	Pro Reaktionsgefäß: 5 µl DEPC-Wasser 1 µl Random Hexamer 1 µl dNTPs 4 µl RNA-Lösung (250 ng/ml)	4 °C	
Denaturierung: Aufspaltung von Sekundärstrukturen	Real-Time-Cycler	65 °C	10 min
Herstellung Mix 2	Pro Reaktionsgefäß: 4 µl 5 x First Strand Buffer 2 µl autoklaviertes Wasser 2 µl DTT 1 µl M-MLV Reverse Transcriptase	4 °C	
cDNA Synthese	Real-Time-Cycler	37 °C	60 min
Inaktivierung der reversen Transkriptase	Real-Time-Cycler	90 °C	5 min
abkühlen		4 °C	
Verdünnen	1:10 in autoklaviertem Wasser	4 °C	
Lagerung	cDNA (-20 °C) / Backup (-50 °C)	-20 °C / -50 °C	

4.5 Arbeitsprotokoll –PCR

Die Durchführung der quantitativen real-time PCR erfolgte nach dem unten genannten Protokoll. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um mögliche Kontaminationen der eingesetzten Reagenzien mit RNA oder DNA auszuschließen wurden folgende Blanks verwendet:

PCR-Mix + Blank 1 (siehe oben)

PCR-Mix + Blank 2 (siehe oben)

PCR-Mix + autoklaviertes Wasser statt der cDNA = Blank 3

Tabelle 24: Protokoll - PCR

Schritt	Durchführung / Reagenz	Temperatur	Dauer
Herstellung PCR-Mix	Pro Reaktionsgefäß: 3,5 µl autoklaviertes Wasser 5 µl Master Mix 0,5 µl Primer	4 °C	
Zugabe der cDNA	Pro Reaktionsgefäß: 1 µl cDNA	4 °C	
Aktivierung der Polymerase	Real-time Cycler	50 °C	2 min
Denaturierung		95 °C	10 min
Denaturierung		95 °C	15 sek.
Annealing, Elongation		60 °C	1 min
			35 – 44 Zyklen

4.6 Bestimmung des Referenzgens

Für die spätere Auswertung wurde eine endogene Kontrolle, welche auch als Referenzgen bezeichnet wird, benötigt. Referenzgene werden idealerweise konstant exprimiert und unterliegen keinen internen oder externen regulatorischen Einflüssen. Dies ermöglicht die Normalisierung der zu untersuchenden Gene über das Referenzgen. Das heißt Unterschiede der Proben durch variierende Effektivität der RNA-Extraktion oder Menge des eingesetzten Templates werden eliminiert, da sie in gleichem Maße das Referenzgen und das Zielgen betreffen [218].

Um unter den vorliegenden Versuchsbedingungen das stabilste Referenzgen zu ermitteln, wurde eine quantitative real-time PCR mit 6 möglichen Referenzgenen durchgeführt (siehe Tabelle 21). Es wurden 3 Tiere pro Gruppe getestet. Anschließend wurde mittels zweier unabhängiger Auswertungsprogramme (DataAssist™, NormFinder) das stabilste Referenzgen, welches in der vorliegenden Studie β -Aktin war, ausgewählt.

4.7 Auswertung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die relative Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dabei wird die relative Expressionsänderung des Zielgens zum Referenzgen und einer Referenzprobe der Kontrollgruppe (Kalibrator) ermittelt [301, 374].

Dafür wurde zunächst eine Schwelle („Threshold“) festgesetzt, an der das Amplifikationssignal signifikant über der Hintergrundfluoreszenz („Baseline“) lag; dies sollte in der exponenziellen Phase der Reaktionskinetik der Fall sein. Daraus konnte der C_T -Wert („cycle threshold“ / „threshold cycle“), der angibt ab welchem Zyklus der Threshold erstmals erreicht wurde, bestimmt werden. Daraufhin wurde aus der Differenz der Zielgen- und Referenzgenexpression der ΔC_T -Wert bestimmt:

$$\Delta C_T \text{ Referenzgen} = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Zusätzlich wurde die Differenz zwischen der Zielgenexpression aller Proben und der Kalibratorprobe ermittelt. Als Kalibratorprobe diente hierbei eine Probe der Kontrollgruppe mit möglichst basaler Expression des Zielgens.

$$\Delta C_T \text{ Kalibrator} = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Kalibrator}$$

Daraus konnte nun der $\Delta\Delta C_T$ -Wert bestimmt werden:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Referenzgen} - \Delta C_T \text{ Kalibrator}$$

Zur Berechnung der relativen Quantität der Expression des Zielgens als Vielfaches der Expression der Referenzprobe wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Relative Quantität} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Eine wichtige Voraussetzung für diese Methode ist eine hohe Effizienz der PCR und eine möglichst gleiche Effektivität zwischen den zu vergleichenden Genen.

Für die verwendeten TaqMan® Gene Expression Assays wurde vom Hersteller eine optimale Effizienz von $100 \pm 10 \%$ bei ordnungsgemäßer Verwendung garantiert.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf

5 ELISA

5.1 Grundlage der Methode

Bei den verwendeten Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) handelte es sich um Sandwich-ELISAs. Hierbei wird die Platte zunächst mit einem für das nachzuweisende Antigen spezifischer Antikörper („Capture Antikörper“) beschichtet. Während der Inkubation der Probe bindet das Antigen an diesen Antikörper. Anschließend bindet ein zweiter, mit einem Detektionssystem gekoppelter Antikörper („Detection Antikörper“) an den Antigen-Antikörperkomplex. Capture Antikörper und Detection Antikörper sollten dabei gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtet sein. Nach Zugabe des Substrats wird dieses durch das Detektionssystem enzymatisch umgesetzt und erzeugt einen Farbumschlag, welcher schließlich zur photometrischen Quantifizierung genutzt werden kann [150, 311, 514].

5.2 Materialien für die ELISAs

Tabelle 25: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien – ELISA

Bezeichnung	Hersteller
Rat IL-10 ELISA Kit	BD Bioscience, San Diego, CAS, USA, Refnr.: 555134
Rat IL-6 ELISA Kit	BD Bioscience, San Diego, CA, USA, Refnr.: 550319
Rat TNF ELISA Kit	BD Bioscience, San Diego, CA, USA, Refnr.: 560479
EZRL-83K / Rat Leptin ELISA	Merck KgaA Millipore, Darmstadt Refnr.: EZRL-83K
96 Well Platten: Nunc-Immuno™ polystyrene Maxisorp ELISA flat bottom plates	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, Refnr.: 442404
Multichannel Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
ELISA-Reader – iEMS Reader MF	MTX Laborsystems Inc.; Vienna VA, USA

Tabelle 26: Substanzen und Chemikalien - ELISA

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coating Buffer IL-6: 0,1M Natriumcarbonat	7,13g NaHCO_3 + 1,59g Na_2CO_3 auf 1 Liter Aqua bidest, pH 9,5
Assay Diluent IL-6 und IL-10 : PBS + 10 % FKS	80 g NaCl + 11,6 g Na_2HPO_4 + 2 g KH_2PO_4 + 2 g KCl auf 10 l Aqua bidest, pH 7,0 + 10 % Fetales Kälber Serum (FKS)

Fetales Kälberserum (FKS)	HyClone™ Fetal Bovine Serum (U.S.) Standard, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Waschpuffer : PBS + 0,05 % Tween-20	80 g NaCl + 11,6 g Na ₂ HPO ₄ + 2 g KH ₂ PO ₄ + 2 g KCl auf 10 l Aqua bidest, pH 7,0 + 0,05 % Tween-20
Tween-20	Appli Chem, Darmstadt
Substrat Solution (Tetramethylbenzidin (TMD) und Wasserstoffperoxid)	BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set Refnr.: 555214
Stop Solution: 2N H ₂ SO ₄	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coating Puffer IL-10: Natriumphosphat	12,49 g Na ₂ HPO ₄ + 15,47 g NaH ₂ PO ₄ auf 1 l Aqua bidest, pH 6,5

5.3 Arbeitsprotokoll

Die ELISAs wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 27: Protokoll – ELISA: IL-6

Schritt	Durchführung / Reagenz	Dauer	Temp.
Coaten	100 µl Coating Puffer + Capture Ak /Well	4 °C	Über Nacht
Waschen	5 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Blocken	200 µl Assay Diluent / Well	1 h	RT
Waschen	5 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Inkubation I	100 µl Probe bzw. Standard / Well	2 h	RT
Waschen	5 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Inkubation II	100 µl Detection Ak / Well	1 h	RT
Waschen	5 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Inkubation III	100 µl Enzym Reagent / Well	30 min	RT
waschen	7 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Inkubation IV	100 µl Substrat Solution / Well	30 min	RT, dunkel
Stoppen	50 µl Stop Solution / Well		
Auslesen	Bei 450 nm (und 570nm)	innerhalb von 30 min	

Tabelle 28: Protokoll – ELISA: IL-10

Schritt	Durchführung / Reagenz	Dauer	Temp.
Coaten	100 µl Coating Puffer + Capture Ak /Well	4 °C	Über Nacht
Waschen	3 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Blocken	200 µl Assay Diluent / Well	1 h	RT
Waschen	3 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Inkubation I	100 µl Probe bzw. Standard / Well	2 h	RT
Waschen	5 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Inkubation II	100 µl Working Detector / Well	1 h	RT
Waschen	7 x 300 µl Waschpuffer / Well		
Inkubation III	100 µl Substrat Solution / Well	30 min	RT, dunkel
Stoppen	50 µl Stop Solution / Well		
Auslesen	Bei 450 nm (und 570nm)	Innerhalb von 30 min	

Tabelle 29: Protokoll – ELISA: TNF α

Schritt	Durchführung / Reagenz	Dauer	Temp
	50 μ l ELISA Diluent / Well		
Inkubation I	100 μ l Probe bzw. Standard / Well	5 Sek. schwenken 2 h	RT
Waschen	3 x 300 μ l Waschpuffer / Well		
Inkubation II	100 μ l Detection Ak / Well	1 h	RT
Waschen	5 x 300 μ l Waschpuffer / Well		
Inkubation III	100 μ l Enzyme working reagent / Well	30 min	RT
Waschen	7 x 300 μ l Waschpuffer / Well		
Inkubation IV	100 μ l TMB One Step Substrate / Well	30 min, dunkel	RT
Stoppen	50 μ l Stop Solution / Well		
Auslesen	Bei 450 nm (und 570nm)	Innerhalb von 30 min	

Tabelle 30: Protokoll – ELISA: Leptin

Schritt	Durchführung / Reagenz	Dauer	Temp.
Waschen	3 x 300 μ l Waschpuffer / Well		
blocken	30 μ l Assay Puffer in die Background Well, Standard Wells und QC1, QC2		
	40 μ l Assay Puffer in alle Probenwells		
	10 μ l Matrix Solution in die die Background Well, Standard Wells und QC1, QC2		
Inkubation I	10 μ l Assay Diluent zu den Background Wells	2 h	RT
	10 μ l von jedem Standard		
	10 μ l von je QC1 und QC2		
	10 μ l Probe in jedes Well		
	Antiserum Solution und Reagent mischen und 50 μ l in jedes Well, Schüttler		
Waschen	3 x 300 μ l Waschpuffer / Well		
Inkubation II	100 μ l Detection Ak / Well, Schüttler	1 h	RT
Waschen	3 x 300 μ l Waschpuffer / Well		
Inkubation III	100 μ l Enzym Solution / Well, Schüttler	30 min	RT
Waschen	6 x 300 μ l Waschpuffer / Well		
Inkubation IV	100 μ l Substrat Solution / Well, Schüttler	5 bis 20 min, bis zum blauen Farbumschlag	RT
Stoppen	100 μ l Stop Solution / Well	Gelber Farbumschlag	
Auslesen	Bei 450 nm und 590nm	Innerhalb von 5 min	

5.4 Auswertung

In jedem Versuch lief eine Standardreihe mit Proben definierter aufsteigender Antigenkonzentration mit. Nach der photometrischen Quantifizierung wurde die Standardreihe dazu genutzt eine Standardkurve zu ermitteln. Aus dieser konnte die Konzentration der Proben mittels GraphPad Prism® bestimmt werden. Für den IL-6, TNF α und IL-10 ELISA betrug die Gruppengröße für die Kontrollgruppe $n = 8$ und für alle weiteren Gruppen $n = 13$. Bei der Analyse von Leptin wurden $n = 5$ Tiere der Kontrollgruppe und $n = 8$ Tiere aller weiteren Gruppen verwendet. Die Analysen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und es wurde jeweils ein Blank mitgeführt, der anstelle der Probe Assay Diluent enthielt. Qualitätskontrollen zwischen den Platten wiesen eine Abweichung von unter 10 % auf. Die Detektionslimits lagen für IL-6 bei 78 pg/ml, für IL-10 bei 15,6 pg/ml, für TNF α bei 31,3 pg/ml und für Leptin bei 0,2 ng/ml.

Tabelle 31: Verdünnung der Proben für die ELISAs

Mediator	Kontrolle	LPS	LPS+VGX	LPS+VGX+VNS
TNF α	unverdünnt	1:2 / 1:8	1:8	1:2
IL-6	1:10	1:250 / 1:500	1:250	1:250
IL-10	1:10	1:100	1:100	1:100
Leptin	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt

6 Statistik

Die Auswertung der Methoden ist in den jeweiligen Kapiteln beschrieben und lieferte die Mittelwerte und den Standardfehler für die einzelnen Versuchsgruppen. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte mit Hilfe des Programms StatView© (SAS Institute Inc., USA) durch eine „One-way ANOVA“ („Analysis of variance“) und einen Fisher's *post-hoc* Test. Um Ausreißer zu entfernen wurden außerdem Werte, welche mehr als den 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) unter dem 25 %-Perzentil oder mehr als den 1,5-fachen IQR über dem 75 %-Perzentil lagen als Ausreißer betrachtet und nicht bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ gesetzt.

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., USA).

III. Ergebnisse

1 Einflüsse einer VGX und VGX+VNS auf klinische und neurophysiologische Parameter während einer LPS induzierten systemischen Entzündung

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit, dem Tiermodell einer LPS induzierten systemischen Inflammation, wurden die Auswirkungen von LPS, LPS+VGX und LPS+VGX+VNS auf die evozierte Flussantwort als Indikator der zerebralen Mikrozirkulation und die SEP Amplituden und Latenzen als Indikator der Gehirnfunktion untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene Parameter dokumentiert, die den klinischen Zustand der Tiere widerspiegeln.

1.1 Neurophysiologische Parameter

Durch die langsame Applikation von LPS konnte ein anaphylaktischer Schock verhindert werden, sodass keines der Versuchstiere durch die LPS Injektion verstarb. Zu Beginn des Versuchs, vor LPS Applikation, wurden weder bei den neurophysiologischen Parameter noch bei den klinischen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt.

LPS bewirkte jedoch alleine, sowie verbunden mit einer zusätzlichen Vagotomie eine Reduktion der evozierten Flussantwort („Evoked Flow Velocity Response“ (EFVR)), die durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation verhindert werden konnte. Somit zeigte die LPS+VGX+VNS Gruppe am Ende des Versuchs (4,5 Stunden) eine signifikant stabilere evozierte Flussantwort als die anderen beiden LPS-behandelten Gruppen.

Auch die SEPs als Indikator der Gehirnfunktion wiesen nach LPS eine ausgeprägte Verringerung der Amplituden auf, die jedoch nach zusätzlicher Vagusnervstimulation weniger deutlich ausfiel als in der LPS und LPS+VGX Gruppe. Im Vergleich zu diesen beiden Gruppen zeigte die LPS+VGX+VNS Gruppe somit am Ende des Versuchs signifikant höhere SEP Amplituden.

Die Latenzen hingegen wiesen nach LPS Applikation eine leichte Verlängerung auf, die sich jedoch zwischen den drei LPS Gruppen nicht signifikant unterschieden.

Die Werte für diese Parameter einschließlich der Signifikanzniveaus sind in Tabelle 32 aufgeführt und in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

	EFVR [%]		SEP [μ V]		Latenz [ms]	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Kontrolle	24 \pm 6	20 \pm 7	11 \pm 5	10 \pm 6	11,2 \pm 0,9	11,9 \pm 1,0
LPS	29 \pm 11	10 \pm 10**	10 \pm 4	4 \pm 2***	11,6 \pm 1,0	13,0 \pm 1,4*
LPS+VGX	30 \pm 9	12 \pm 14*	9 \pm 4	4 \pm 3***	11,6 \pm 0,9	13,0 \pm 1,4*
LPS+VGX+VNS	24 \pm 9	19 \pm 9#\$	12 \pm 5	7 \pm 5*#\$	11,5 \pm 1,0	13,1 \pm 1,4*

Tabelle 32: Durchschnittliche Werte für die EFVR, die SEPs und die Latenzen als Mittelwerte \pm Standardabweichung. LPS führte zu einer Verringerung der evozierten Flussantwort und SEP Amplituden in der LPS und LPS+VGX Gruppe. Dies konnte durch eine Vagusnervstimulation verhindert bzw. abgeschwächt werden. Auch die Latenzen zeigten eine LPS bedingte Verlängerung, die sich jedoch zwischen den LPS Gruppen nicht signifikant unterschied.

Beginn = vor LPS Applikation, Ende = 4,5 h nach LPS Applikation, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, EFVR = evoked flow velocity response, SEP = somatosensorisch evoziertes Potential.

Verglichen wurden jeweils die verschiedenen Gruppen untereinander: * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen mit LPS (# = $p \leq 0,05$), \$ = verglichen mit LPS+VGX (\$ = $p \leq 0,05$).

1.2 Klinische Parameter

Die durch mehrere Maßnahmen konstant gehaltenen Parameter Körpertemperatur, Blutglukosespiegel sowie der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck unterschieden sich weder vor LPS Applikation (Beginn) noch 4,5 Stunden nach LPS Applikation (Ende) zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Sie blieben außerdem über den Versuchszeitraum nahezu konstant. Die Ergebnisse für diese Parameter sind in

Tabelle 33 aufgeführt.

	Temperatur [°C]		Glukose [mg/dl]		pO ₂ [mmHG]		pCO ₂ [mmHG]	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Kontrolle	37,3 \pm 0,3	37,2 \pm 0,4	82 \pm 27	71 \pm 13	252 \pm 26	223 \pm 16	35 \pm 4	35 \pm 2
LPS	37,4 \pm 0,2	37,4 \pm 0,2	84 \pm 26	72 \pm 18	239 \pm 16	214 \pm 17	37 \pm 3	36 \pm 3
LPS+VGX	37,3 \pm 0,1	37,4 \pm 0,1	98 \pm 20	75 \pm 17	249 \pm 17	223 \pm 14	38 \pm 4	34 \pm 2
LPS+VGX+VNS	37,3 \pm 0,2	37,4 \pm 0,1	95 \pm 24	79 \pm 22	242 \pm 24	220 \pm 26	36 \pm 5	36 \pm 3\$

Tabelle 33: Durchschnittliche Werte von Temperatur, Glukose, pO₂ und pCO₂ als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die hier aufgeführten Parameter wurden durch LPS nicht beeinflusst und blieben auch über den Versuchszeitraum nahezu konstant.

Beginn = vor LPS Applikation, Ende = 4,5 h nach LPS Applikation, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, pO₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck, pCO₂ = arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck.

Ergebnisse

Verglichen wurden jeweils die verschiedenen Gruppen untereinander: \$ = verglichen mit LPS+VGX und $p \leq 0,05$.

Nach Applikation von LPS zeigten die Tiere in allen drei LPS Gruppen als Anzeichen eines septischen Schocks einen signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks. Dabei zeigte sich der Blutdruck in der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe tendenziell geringfügig stabiler als in der LPS+VGX Gruppe ($p = 0,09$). Gleichzeitig stieg die Laktatkonzentration im Blut der LPS Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich an. Dabei fiel der Anstieg der Laktatkonzentration jedoch nach zusätzlicher Vagusnervstimulation geringer aus, als nach alleiniger LPS Applikation oder zusätzlicher Vagotomie. Zusätzlich bewirkte LPS eine Azidose in allen septischen Gruppen. Der Hämatokrit unterschied sich zu Beginn und am Ende des Versuchs zwischen den einzelnen Gruppen nicht, nahm jedoch im Verlauf des Versuches insgesamt leicht ab. Die Ergebnisse für den Hämatokrit, den Blutdruck, die Laktatkonzentration und den pH-Wert, einschließlich der Signifikanzniveaus sind in Tabelle 34 aufgeführt. Des Weiteren sind der Blutdruck und die Laktatkonzentration in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

	Blutdruck [mmHG]		Hämatokrit [%]		pH		Laktat [mmol/l]	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Kontrolle	114 ± 12	100 ± 24	41 ± 3	36 ± 4	7,50 ± 0,03	7,49 ± 0,04	1,3 ± 0,7	1,0 ± 1,0
LPS	107 ± 9	50 ± 12***	40 ± 2	37 ± 1	7,49 ± 0,05	7,42 ± 0,04***	1,2 ± 0,6	5,1 ± 1,3***
LPS+VGX	108 ± 10	49 ± 13***	42 ± 3	37 ± 2	7,48 ± 0,03	7,42 ± 0,05***	1,2 ± 0,7	4,9 ± 1,5***
LPS+VGX +VNS	114 ± 12	59 ± 19***	42 ± 2	36 ± 1	7,49 ± 0,03	7,43 ± 0,04***	1,2 ± 0,5	3,9 ± 0,9***# \$

Tabelle 34: Durchschnittliche Werte für den Blutdruck, den Hämatokrit, den pH-Wert und die Laktatkonzentration als Mittelwerte ± Standardabweichung. LPS induzierte einen starken Blutdruckabfall in allen septischen Gruppen. Des Weiteren führte LPS zu einem signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration, der jedoch in der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe geringer ausfiel als in der LPS und LPS+VGX Gruppe. Zusätzlich zeigten alle septischen Gruppen eine ausgeprägte Azidose. Der Hämatokrit unterschied sich zwischen den Gruppen nicht, nahm jedoch im Verlauf des Versuches leicht ab.

Beginn = vor LPS Applikation, Ende = 4,5 h nach LPS Applikation, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation.

Verglichen wurden jeweils die verschiedenen Gruppen untereinander: * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen mit LPS (# = $p \leq 0,05$), \$ = verglichen mit LPS + VGX (\$ = $p \leq 0,05$).

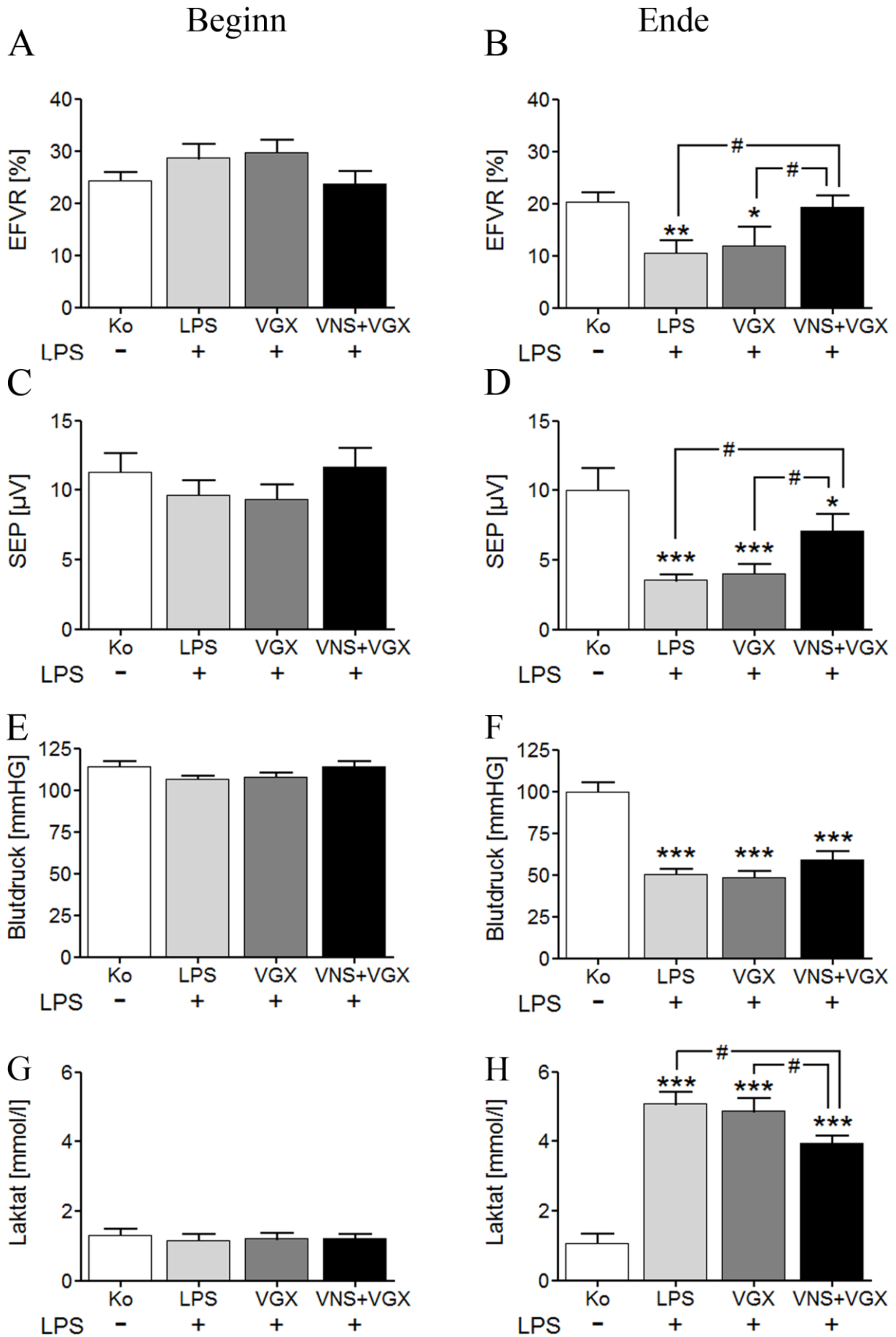


Abbildung 26: Mittelwerte für die evozierte Flussantwort (A, B), die SEP Amplituden (B, C), den mittleren arteriellen Blutdruck (D, E) und die Laktatkonzentration (F, G) jeweils vor (A, C, E, G) und 4,5 Stunden nach LPS Applikation (B, D, F, H). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS induzierte eine Reduktion der evozierten Flussantwort, eine Abnahme der SEP Amplituden, einen Abfall des Blutdrucks und einen Anstieg der Laktatkonzentration. Allerdings konnte eine zusätzliche Vagusnervstimulation die evozierte Flussantwort und SEP Amplituden stabilisieren und den Anstieg der Laktatkonzentration verringern.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, EFVR = evoked flow velocity response, SEP = somatosensorisch evoziertes Potential.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$); # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$).

2 Einflüsse einer VGX und einer VGX+VNS auf Faktoren des humoralen und zellulären Signalwegs während einer LPS induzierten systemischen Entzündung

Der zweite Teil der Arbeit beleuchtet nun die Frage, durch welche Mechanismen die oben genannten Effekte der Vagusnervstimulation vermittelt werden könnten. Dafür wurden Zielparameter aus der Peripherie, dem Hypothalamus und dem Cortex untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um Faktoren des humoralen Signalwegs wie Zytokine, aber auch um Transkriptionsfaktoren und deren Zielgen, zum anderen um Mediatoren des zellulären Signalwegs wie Immunzellen und Faktoren, welche für die Migration und Adhäsion von Immunzellen von Bedeutung sind.

2.1 Peripherie

Zunächst wurde als Marker der peripheren Entzündungsreaktion die Plasmakonzentration verschiedener inflammatorischer Zytokine bestimmt.

2.1.1 Zytokine

LPS bewirkte einen Anstieg der TNF α , IL-6 und IL-10 Plasmakonzentrationen. Eine zusätzliche Vagusnervstimulation führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion des LPS bedingten Anstiegs der TNF α und IL-6 Plasmakonzentration verglichen mit der LPS Gruppe. Die LPS+VGX+VNS Gruppe zeigte außerdem eine Tendenz zu einem verminderten TNF α ($p = 0,06$) und IL-6 ($p = 0,10$) Anstieg verglichen mit der LPS+VGX Gruppe.

Die IL-10 Plasmakonzentration zeigte sich in der zusätzlich vagotomierten Gruppe im Vergleich mit der reinen LPS Gruppe und der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe signifikant erhöht. Zwischen der LPS und der LPS+VGX+VNS Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der TNF α und IL-6 Plasmakonzentration verglichen mit der LPS Gruppe führte. Außerdem bewirkte LPS in der zusätzlich vagotomierten Gruppe eine erhöhte IL-10 Plasmakonzentration verglichen mit der LPS und LPS+VGX+VNS Gruppe.

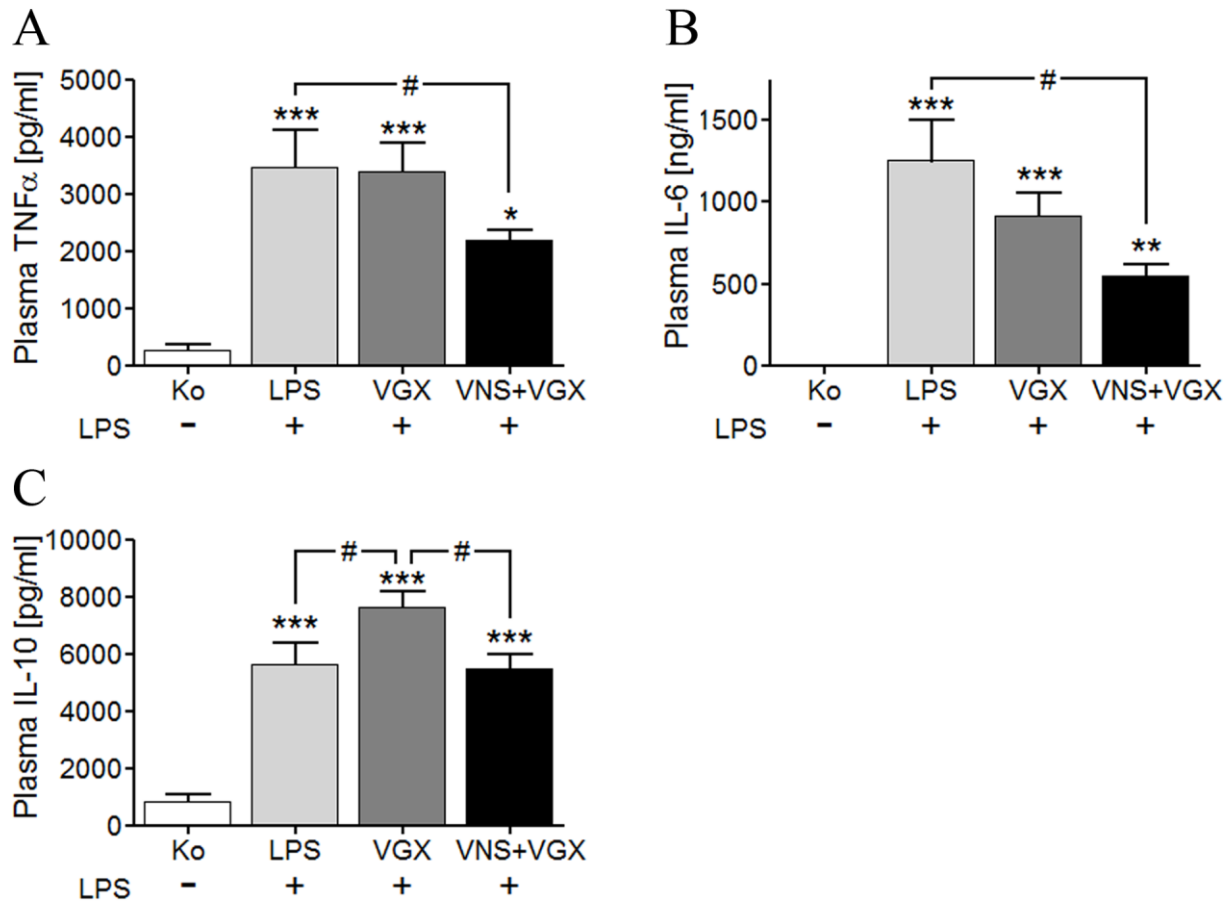


Abbildung 27: Plasmakonzentration von TNF α , IL-6 und IL-10; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS bewirkte einen Anstieg der TNF α , IL-6 und IL-10 Plasmakonzentration. Eine zusätzliche Vagusnervstimulation führte jedoch zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der TNF α und IL-6 Plasmakonzentration verglichen mit der LPS Gruppe und tendenziell auch verglichen mit der LPS+VGX Gruppe. Die IL-10 Plasmakonzentration war in der zusätzlich vagotomierten Gruppe im Vergleich mit der LPS und LPS+VGX+VNS Gruppe signifikant erhöht.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$).

2.2 Hypothalamus

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die in der Peripherie beobachteten Unterschiede in der Induktion inflammatorischer Mediatoren auch im ZNS widerspiegeln. Dabei erfolgte zunächst die Untersuchung des Hypothalamus, der den überwiegenden Teil der CVOs beinhaltet. CVOs besitzen eine unvollständige BBB und sind deshalb wichtig für die Kommunikation zwischen der Peripherie und dem ZNS (siehe Kapitel I 2.1.1 und 2.1.2).

2.2.1 Zytokine

Mittels PCR wurde die mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-17 und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Hypothalamus untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

LPS induzierte nach 4,5 Stunden einen signifikanten Anstieg der Expression aller untersuchten Zytokine im Hypothalamus. $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 β zeigten dabei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen septischen Gruppen. Dahingegen bewirkte die zusätzliche Vagusnervstimulation eine deutlich verminderte Induktion der IL-6 und IL-10 mRNA verglichen mit der LPS Gruppe. Bei IL-6 zeigte sich zusätzlich eine Tendenz zu einer verringerten IL-6 Expression der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe verglichen mit der zusätzlich vagotomierten Gruppe ($p = 0,06$). IL-17 zeigte insgesamt eine sehr geringe Expression, wobei alle Proben der Kontrollgruppe unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Auch wenn sich die Expression der septischen Gruppen nicht unterschied, so gab es doch Unterschiede in der Anzahl der detektierbaren Proben. So konnte in der LPS und LPS+VGX Gruppe in 4 von 5 Proben IL-17 detektiert werden, während IL-17 nach einer zusätzlichen Vagusnervstimulation nur in 3 von 5 Proben detektierbar war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einer verminderten LPS bedingten Induktion der IL-6 und IL-10 mRNA Expression im Hypothalamus führte, während die $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β und IL-17 Expression unbeeinflusst blieb.

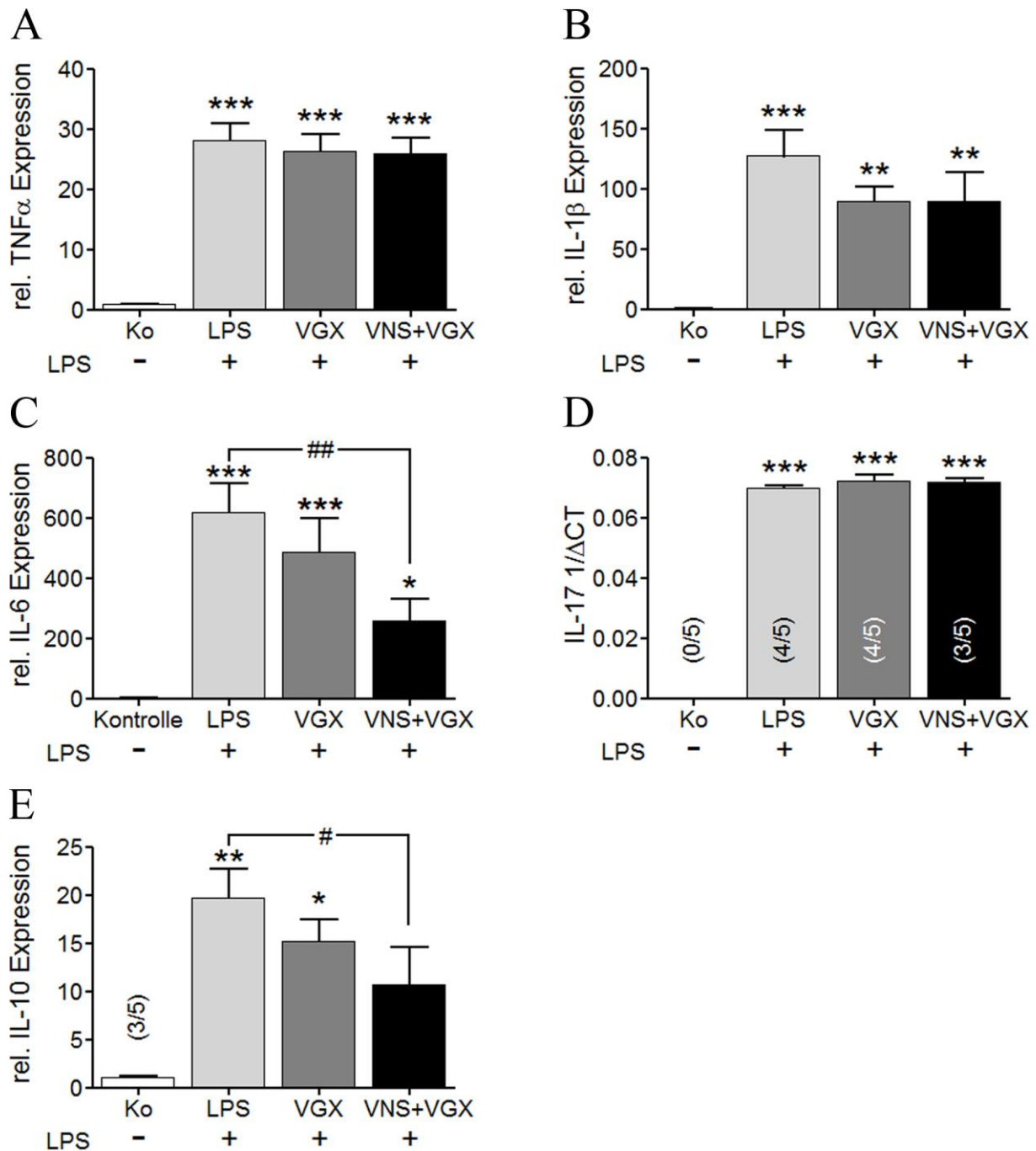


Abbildung 28: Relative Expression von TNFα (A), IL-1β (B), IL-6 (C), IL-17 (D) und IL-10 (E) im Hypothalamus. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS induzierte einen Anstieg der mRNA Expression von TNFα, IL-1β, IL-6, IL-17 und IL-10 im Hypothalamus; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Bei TNFα und IL-1β zeigten sich keine Unterschiede zwischen den septischen Gruppen, während eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einer verminderten Induktion der IL-6 und IL-10 Expression führte. IL-17 zeigte insgesamt eine sehr geringe Expression. Auch wenn sich die IL-17 Expression der septischen Gruppen nicht unterschied, so gab es doch Unterschiede in der Anzahl der detektierbaren Proben.

Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, TNF = Tumornekrosefaktor, IL = Interleukin, CT = cycle threshold

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$)

2.2.2 Transkriptionsfaktoren

Um die inflammatorische Aktivierung von Zellen des Hypothalamus zu analysieren, wurde die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren bzw. ihrer Inhibitoren I κ B α , SOCS3 und NF-IL6 untersucht.

Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren zeigten 4,5 Stunden nach LPS Applikation einen Anstieg ihrer Expression im Hypothalamus. Während für I κ B α keine Unterschiede zwischen den septischen Gruppen nachweisbar waren, bewirkte eine zusätzliche Vagusnervstimulation eine verminderte LPS bedingte Induktion der SOCS3 Expression verglichen mit der LPS Gruppe. Außerdem bewirkte die zusätzliche Vagusnervstimulation eine verminderte Induktion der NF-IL6 Expression sowohl verglichen mit der LPS als auch der LPS+VGX Gruppe.

Um zu untersuchen, ob diese Veränderungen der hypothalamischen NF-IL6 Expression auch mit einer Änderung der NF-IL6 Menge auf Proteinebene im Gewebe einhergeht, wurde außerdem eine immunhistochemische Untersuchung von NF-IL6 im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* durchgeführt. Dabei konnte in den Kontrolltieren keine NF-IL6 Immunreaktivität nachgewiesen werden, während LPS in der LPS und LPS+VGX Gruppe starke nukleäre NF-IL6 Signale induzierte. Auch in der LPS+VGX+VNS Gruppe waren nukleäre NF-IL6 Signale nachweisbar, allerdings war hier der prozentuale Anteil NF-IL6 positiver Nuklei signifikant geringer, als in der LPS und LPS+VGX Gruppe. Somit konnten die Ergebnisse der NF-IL6 PCR untermauert werden. Interessanter Weise konnten in der immunhistologischen Untersuchung der septischen Gruppen auch NF-IL6 positive NG detektiert werden. Ihre Anzahl konnte jedoch nicht näher quantifiziert werden.

Die Ergebnisse der PCR Untersuchungen von I κ B α , SOCS3 und NF-IL6, sowie die Quantifizierung der NF-IL6 positiven Nuklei sind in Abbildung 29 graphisch dargestellt. Des Weiteren zeigt die Abbildung 30 die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung von NF-IL6 im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus*.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einer verminderten LPS bedingten Induktion der SOCS3 und NF-IL6 mRNA Expression verglichen mit der LPS bzw. der LPS und LPS+VGX Gruppe im

Hypothalamus führte. Dies konnte für NF-IL6 auch in einer immunhistologischen Untersuchung des SFO und angrenzenden *Plexus choroideus* bestätigt werden.

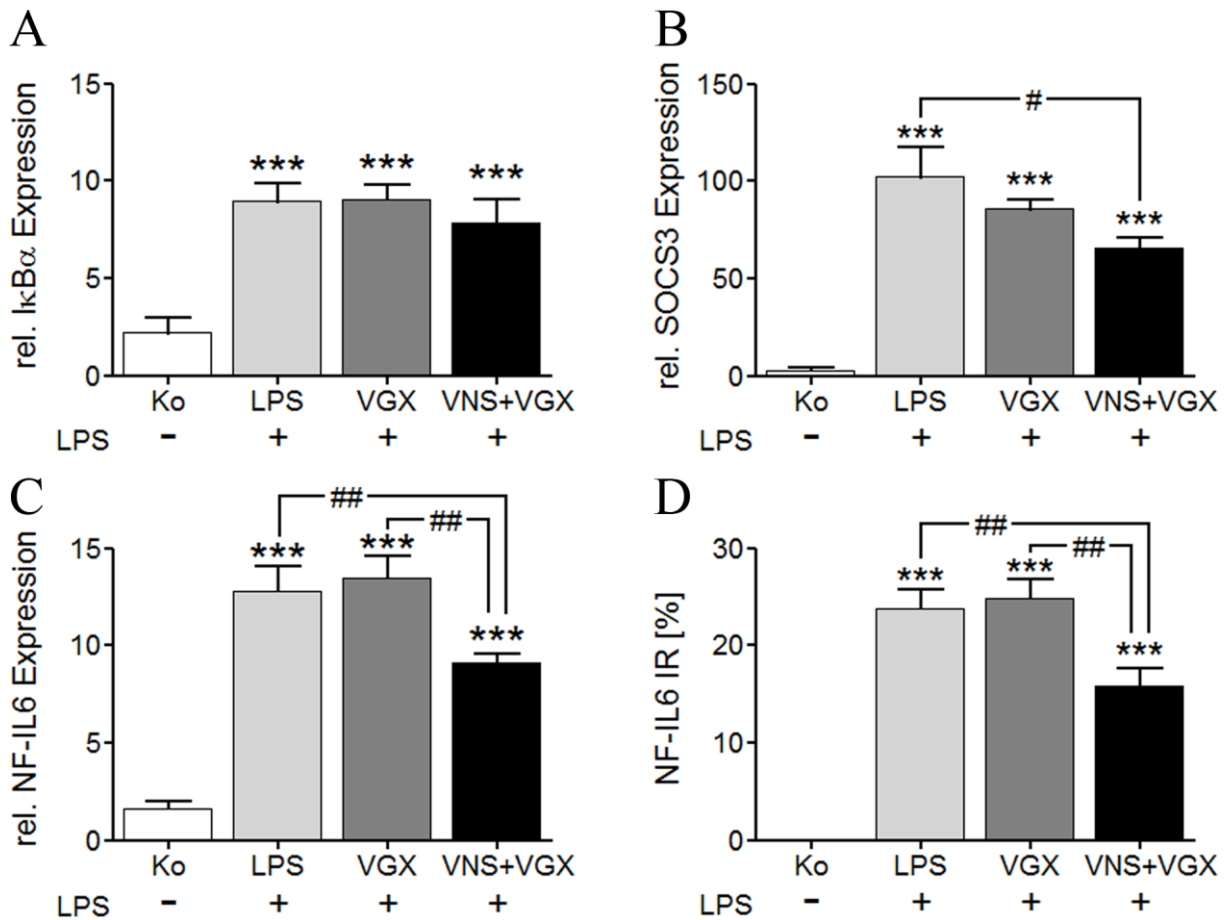


Abbildung 29: Relative Expression von IkBα (A), SOCS3 (B) und NF-IL6 (C) nachgewiesen mittels PCR und der prozentuale Anteil NF-IL6 positiver Nuklei (D) nachgewiesen mittels Immunfluoreszenz; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS bewirkte einen Anstieg der mRNA Expression von IkBα, SOCS3 und NF-IL6 im Hypothalamus, sowie eine Induktion der nukleären NF-IL6 Immunreaktivität im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus*. Während die septischen Gruppen keine Unterschiede in der IkBα Expression aufwiesen, führte eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einer verminderten Induktion der SOCS3 Expression. Für NF-IL6 konnte sowohl mittels PCR als auch mittels Immunhistochemie ebenfalls eine Verringerung der NF-IL6 Expression verglichen zur LPS und LPS+VGX Gruppe nachgewiesen werden.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, IkBα = Inhibitor of κBα, SOCS = suppressor of cytokine signalling, NF-IL6 = nuclear factor IL-6.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$).

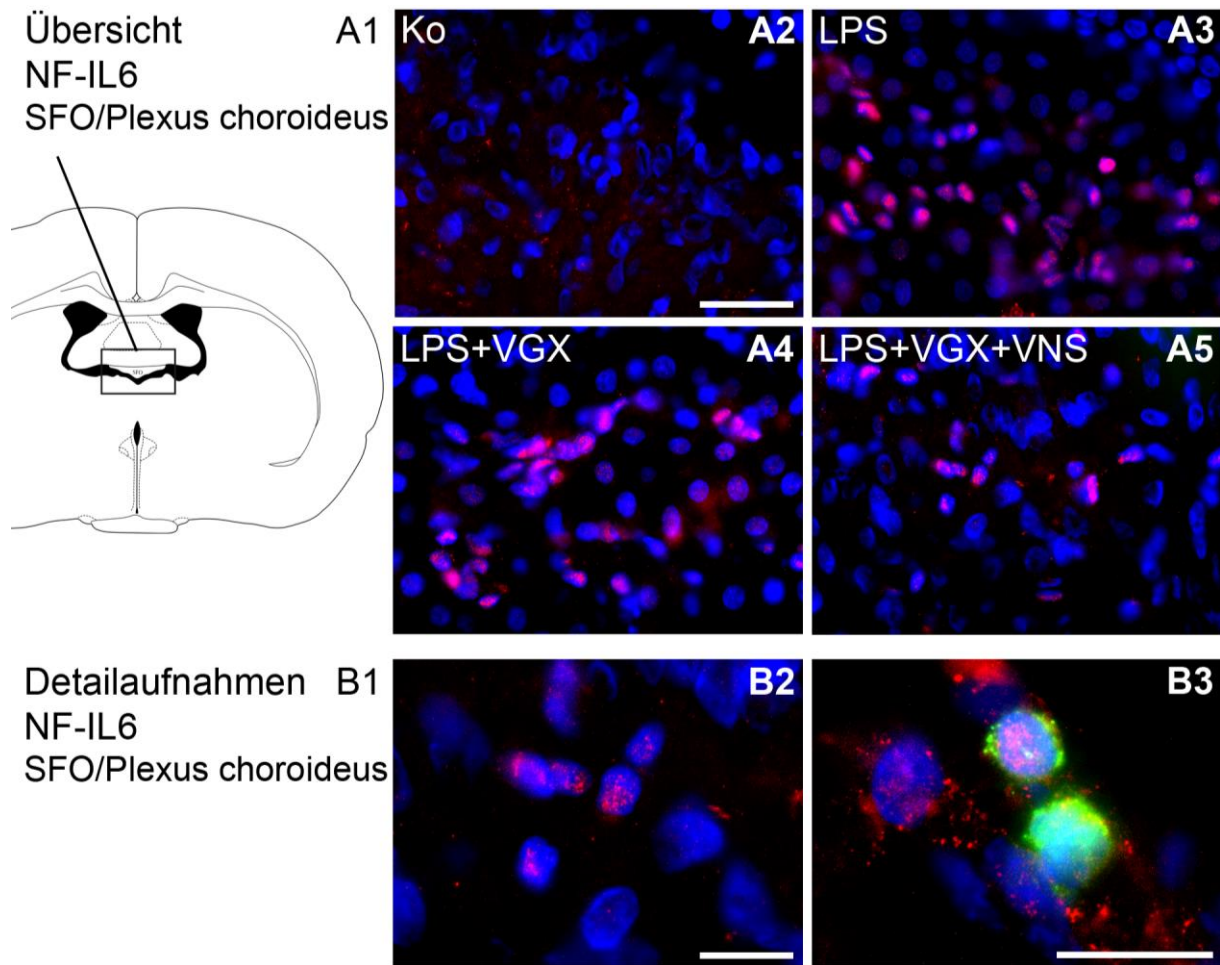


Abbildung 30: Immunhistologische Darstellung der nukleären NF-IL6 Immunreaktivität im SFO und angrenzendem Plexus choroideus; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Während in den Kontrolltieren (A2) keine NF-IL6 Immunreaktivität detektierbar war, induzierte LPS starke nukleäre NF-IL6 Signale in den septischen Gruppen. Dabei war der prozentuale Anteil NF-IL6 positiver Zellen in der LPS+VGX+VNS (A5) Gruppe signifikant geringer als in der LPS (A3) und LPS+VGX (A4) Gruppe. Die Bilder B2 und B3 zeigen Detailaufnahmen der nukleären NF-IL6 Immunreaktivität (B2), die in allen septischen Gruppen zu beobachten war und sich lediglich in der Quantität unterschied und eines NF-IL6 positiven neutrophilen Granulozyten (B3). Zellkerne sind mittels DAPI in blau dargestellt, NF-IL6 in rot und der Neutrophilenmarker Myeloperoxidase in grün. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 25 µm und gilt für die Bilder A2 – A5, die Größenmarker in Bild B2 und B3 entsprechen jeweils 10 µm.

Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, SFO = *Organum subfornicale*.

2.2.3 Zielgene

Als wichtige Faktoren für die Regulation der zerebralen Mikrozirkulation, und repräsentative Zielgene der untersuchten Transkriptionsfaktoren, wurde die Expression von COX2 und mPGES, mittels PCR untersucht.

Dabei induzierte LPS nach 4,5 Stunden einen Anstieg der COX2 und mPGES Expression im Hypothalamus. Während die zusätzliche Vagusnervstimulation bei

COX2 zu einer verminderten Induktion der Expression verglichen mit der zusätzlich vagotomierten Gruppe führte, zeigte die mPGES Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Gruppen. Die Ergebnisse für die COX2 und mPGES Expression sind in Abbildung 31 graphisch dargestellt.

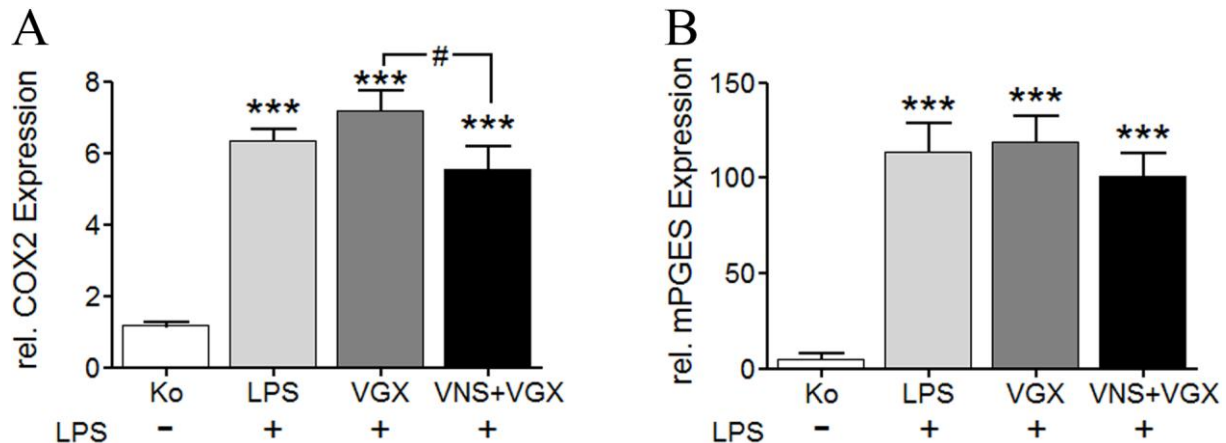


Abbildung 31: Relative Expression von COX2 (A) und mPGES (B) im Hypothalamus; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS induzierte einen Anstieg der COX2 und mPGES Expression, der bei COX2 durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation vermindert wurde, während für mPGES keine Unterschiede zwischen den septischen Gruppen nachweisbar waren.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, COX = Cyclooxygenase, mPGES = mikrosomale Prostaglandin E Synthase. * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$)

2.2.4 Lymphozyten und Mikroglia

Um neben den Faktoren des humoralen auch die des zellulären Signalwegs zu untersuchen, wurde zum einen die Anzahl von T-Lymphozyten im SFO und benachbartem *Plexus choroideus* mittels Immunhistologie untersucht und zum anderen die mRNA Expression von CD68, als Marker für mikrogliale Aktivierung mittels PCR analysiert (siehe Abbildung 32).

Insgesamt war die Anzahl von T-Lymphozyten im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* gering. LPS induzierte einen leichten Anstieg der T-Lymphozyten Anzahl, wobei sich zwischen den septischen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zeigten (LPS verglichen mit LPS+VGX+VNS: $p = 0,13$). Die analysierte Fläche betrug jeweils etwa 0,5 mm².

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Anzahl an T-Lymphozyten im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* sind in Abbildung 33 dargestellt.

LPS führte ebenfalls zu einem Anstieg der CD68 Expression im Hypothalamus, wobei jedoch keine Unterschiede zwischen den septischen Gruppen auftraten. Die zusätzlich vagotomierte Gruppe zeigte jedoch eine Tendenz zu einer geringfügig verminderten LPS bedingten Induktion der CD68 Expression ($p = 0,09$). Die Quantifizierung der immunhistologischen Untersuchung der T-Lymphozyten Anzahl im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* und der Expression der CD68 mRNA im Hypothalamus sind in Abbildung 32 graphisch dargestellt.

Zusammenfassend konnten keine signifikanten Einflüsse einer Manipulation des *N. vagus* auf die Anzahl der T-Lymphozyten im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* sowie der CD68 Expression im Hypothalamus nach LPS Applikation nachgewiesen werden.

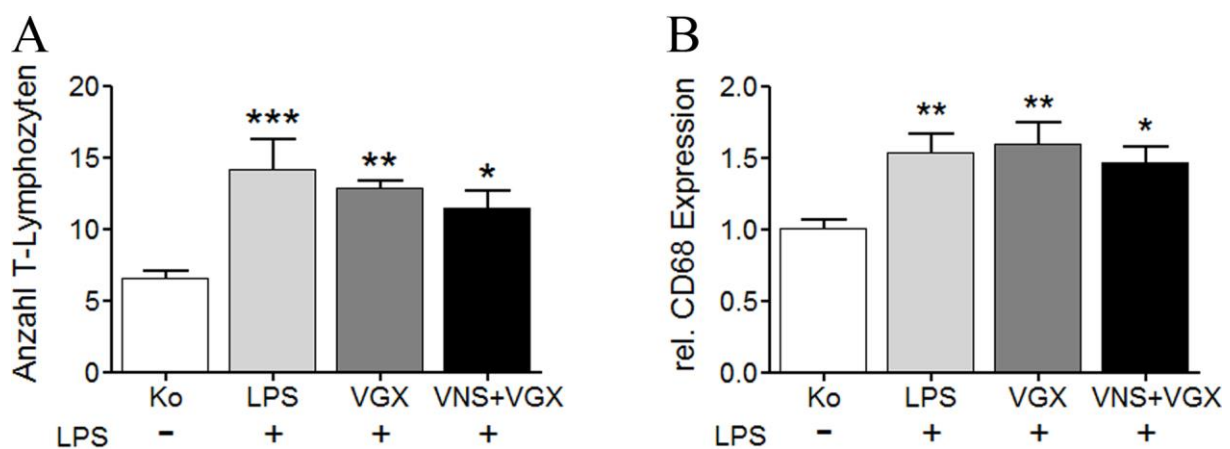


Abbildung 32: Anzahl von T-Lymphozyten im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* (A), nachgewiesen mittels Immunhistologie und die relative Expression von CD68 (B) im Hypothalamus, nachgewiesen mittels PCR; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS bewirkte einen leichten Anstieg der T-Lymphozyten Anzahl im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* sowie der CD68 Expression im Hypothalamus, wobei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Gruppen auftraten.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative. * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$)

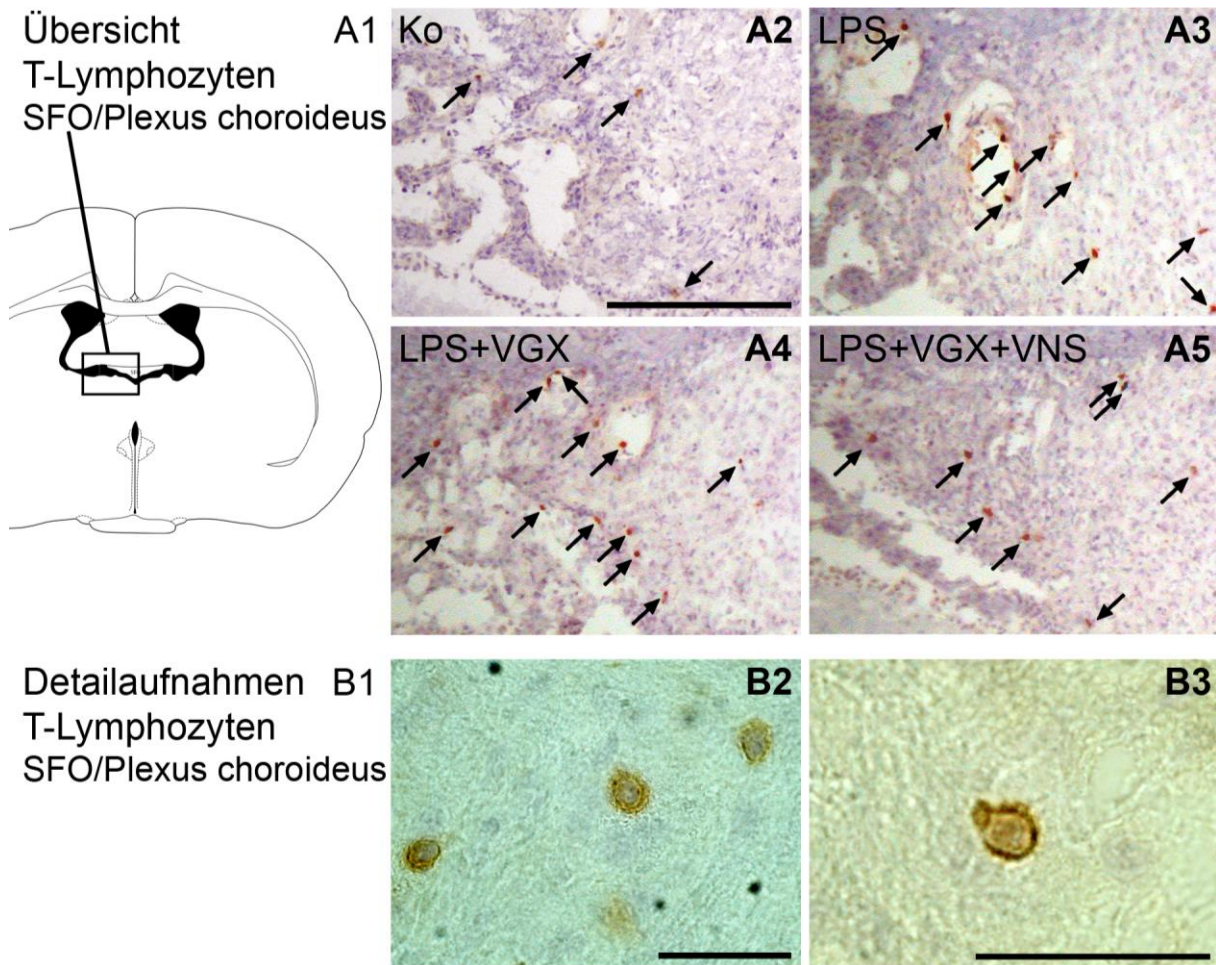


Abbildung 33: Immunhistologischer Nachweis von T-Lymphozyten (braun) im SFO und angrenzendem Plexus choroideus (A2 – A5) und Detailaufnahmen von T-Lymphozyten (B2, B3); 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Mittels der immunhistologischen Untersuchung konnte eine geringe Anzahl von T-Lymphozyten im SFO und angrenzendem Plexus choroideus nachgewiesen werden (A2), die nach LPS Applikation anstieg (A3 – A5). Dabei erreichten die Unterschiede zwischen den septischen Gruppen jedoch keine Signifikanz. Die Detailaufnahmen zeigen typische Bilder von T-Lymphozyten, wie sie in allen Gruppen zu beobachten waren. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 200 µm und gilt für die Bilder A2 – A5 und die Größenmarker in den Bildern B2 und B3 entsprechen jeweils 25 µm. Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, SFO = *Organum subfornicale*.

2.2.5 Faktoren mit Bedeutung für die Adhäsion und Migration von Immunzellen

Um nicht nur die Anzahl von Immunzellen zu bestimmen, sondern auch Mechanismen für ihre Migration zu untersuchen, wurden das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das Chemokin CXCL1 analysiert.

LPS induzierte nach 4,5 Stunden einen Anstieg der CXCL1 Expression im Hypothalamus in allen septischen Gruppen. Eine zusätzliche Vagusnervstimulation

führte jedoch zu einer signifikant geringeren Induktion der CXCL1 Expression als in der LPS Gruppe. Auch verglichen mit der LPS+VGX Gruppe zeigte sich eine Tendenz zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der CXCL1 Expression durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation ($p = 0,08$). Zusätzlich zeigte jedoch auch die vagotomierte Gruppe eine leichte Tendenz zu einer geringeren CXCL1 Expression verglichen mit der reinen LPS Gruppe ($p = 0,10$).

Die ICAM-1 Expression wurde ebenfalls durch LPS vermehrt induziert. Hier zeigte wiederum die LPS+VGX+VNS Gruppe einen deutlich geringeren Anstieg der ICAM-1 Expression als die beiden anderen septischen Gruppen. Um zu überprüfen, ob sich diese Änderung der mRNA Expression auch in der ICAM-1 Menge auf Proteinebene im Gewebe widerspiegelt, wurde zusätzlich eine immunhistologische Untersuchung des SFO und des angrenzenden *Plexus choroideus* durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche ICAM-1 Immunreaktivität in allen untersuchten Gruppen, unabhängig von der LPS Applikation. Besonders ausgeprägt war diese im Bereich des *Plexus choroideus* zu beobachten, aber auch im SFO waren deutliche ICAM-1 Signale sichtbar. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Somit konnte die immunhistologische Untersuchung die Ergebnisse der PCR nicht bestätigen.

Die Quantifizierung der relativen CXCL1 und ICAM-1 Expression, sowie der prozentuale Anteil von ICAM-1 Signalen an der Gesamtfläche der Schnitte sind in Abbildung 34 graphisch dargestellt. Des Weiteren zeigt die Abbildung 35 die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung von ICAM-1 im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus*.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzlich Vagusnervstimulation zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der CXCL1 und ICAM-1 Expression im Hypothalamus verglichen mit der LPS bzw. LPS und LPS+VGX Gruppe führte. In der immunhistologischen Untersuchung des SFO und angrenzenden *Plexus choroideus*, zeigte sich jedoch eine starke ICAM-1 Immunreaktivität in allen untersuchten Gruppen, auch der Kontrollgruppe. Es ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

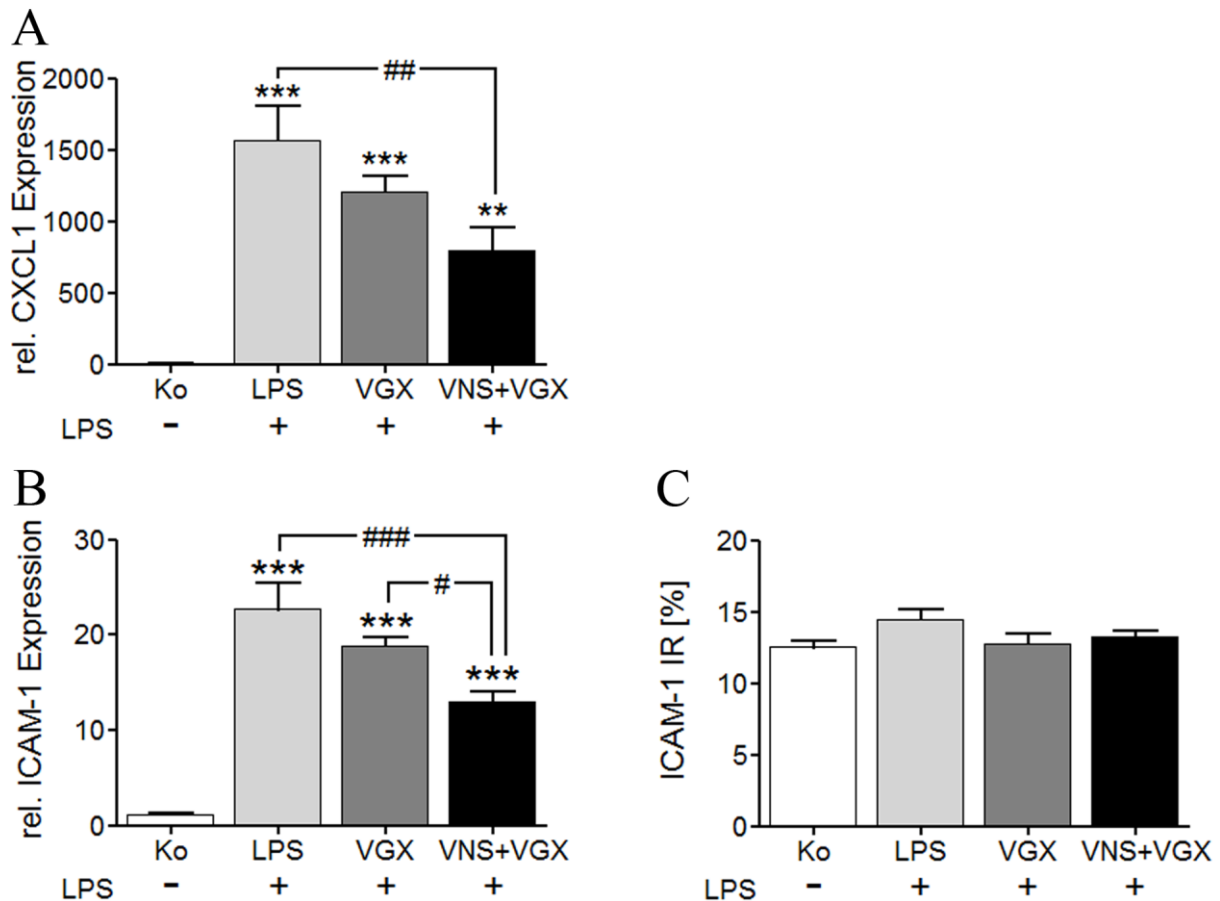


Abbildung 34: Relative Expression von CXCL1 (A) und ICAM-1 (B) im Hypothalamus, nachgewiesen mittels PCR und der Anteil der ICAM-1 Immunreaktivität (C) an der Gesamtfläche des Schnitts im SFO und angrenzenden *Plexus choroideus*; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS induzierte einen Anstieg der mRNA Expression von CXCL1 und ICAM-1, wobei eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einem geringeren Anstieg der CXCL1 Expression verglichen mit der LPS Gruppe und einem geringeren Anstieg der ICAM-1 Expression verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe führte. In der immunhistologischen Untersuchung zeigte sich unabhängig von der LPS Applikation eine deutliche ICAM-1 Immunreaktivität vor allem im *Plexus choroideus* aber auch im SFO. Hierbei ergaben sich keine Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, ICAM = „intercellular adhesion molecule“.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$).

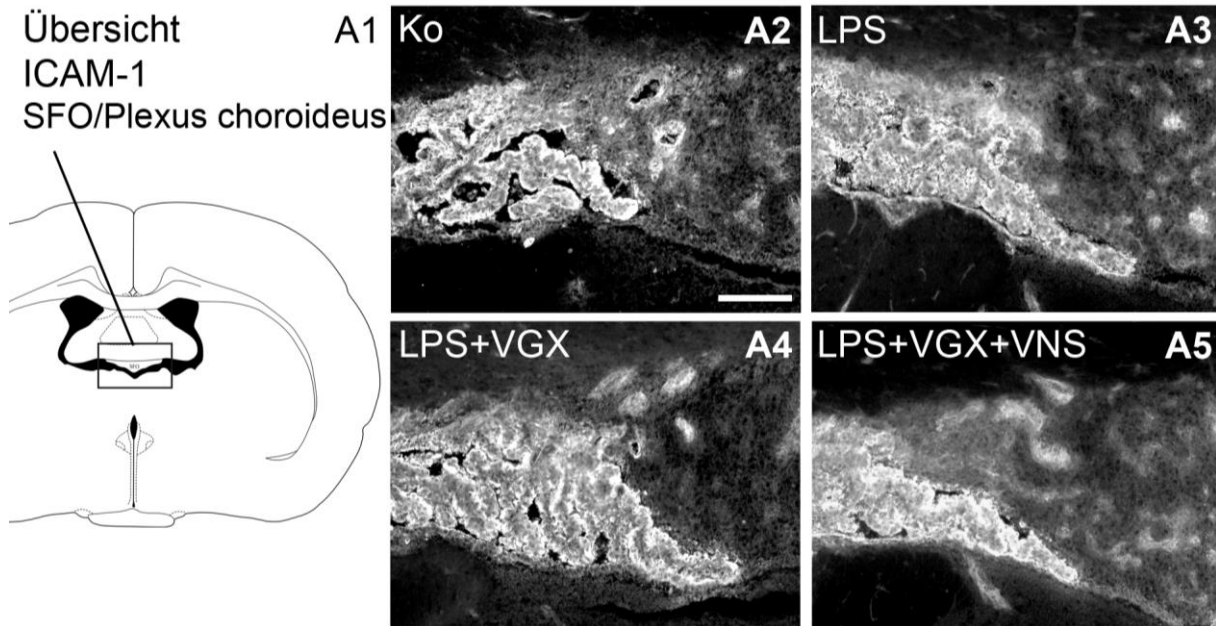


Abbildung 35: Immunhistologischer Nachweis von ICAM-1 (A2 – A5) im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus*; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. In der immunhistologischen Untersuchung zeigte sich unabhängig von der LPS Applikation eine deutliche ICAM-1 Immunreaktivität vor allem im *Plexus choroideus* aber auch im SFO. Hierbei ergaben sich keine Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen. ICAM-1 ist weiß dargestellt auf schwarzem Grund. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 100 µm und gilt für die Bilder A2 – A5.

Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, ICAM = „intercellular adhesion molecule“, SFO = *Organum subfornicale*.

2.2.6 Neutrophile Granulozyten

Als weitere Immunzellpopulation wurden außerdem NG untersucht. Dabei wurde einerseits die mRNA Expression von ELANE („Elastase, neutrophil expressed“), einem Gen, das in NG für das Enzym Elastase codiert im Hypothalamus mittels PCR analysiert und andererseits die Anzahl NG im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* mittels einer immunhistologischen Untersuchung bestimmt. Von Interesse war außerdem eine potenzielle Kolokalisation der Immunreaktivität von NG und ICAM-1.

Die mRNA Expression von ELANE war insgesamt niedrig. In der Kontrollgruppe lag eine Probe unterhalb der Nachweisgrenze, in den septischen Gruppen waren alle Proben detektierbar. Es konnte demnach die Rekrutierung von NG hiermit nachgewiesen werden. Es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, auch wenn die zusätzlich vagotomierte Gruppe tendenziell eine Erhöhung der ELANE Expression verglichen mit der Kontrollgruppe zeigte ($p = 0,09$).

In der immunhistologischen Untersuchung zeigte sich ein deutlicher LPS bedingter Anstieg der Anzahl NG im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus*. Dabei fiel die Erhöhung der Anzahl NG in der zusätzlich vagotomierten Gruppe tendenziell geringer aus als in den anderen septischen Gruppen ($p = 0,10$). Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Gruppen. Die NG waren häufig in großen Gefäßen des SFO und im Bereich des *Plexus choroideus* lokalisiert (siehe Abbildung 37, B2 und B3). Aufgrund der sehr starken ICAM-1 Expression zeigten nahezu alle NG eine Kolokalisation mit ICAM-1 in dieser Region.

Die ELANE Expression im Hypothalamus und die Anzahl NG im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* ist in Abbildung 36 graphisch dargestellt. Des Weiteren zeigt die Abbildung 37 die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung.

Zusammenfassend konnten keine signifikanten Einflüsse einer Manipulation des *N. vagus* auf die ELANE Expression im Hypothalamus und die Anzahl NG im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* nach LPS Applikation nachgewiesen werden.

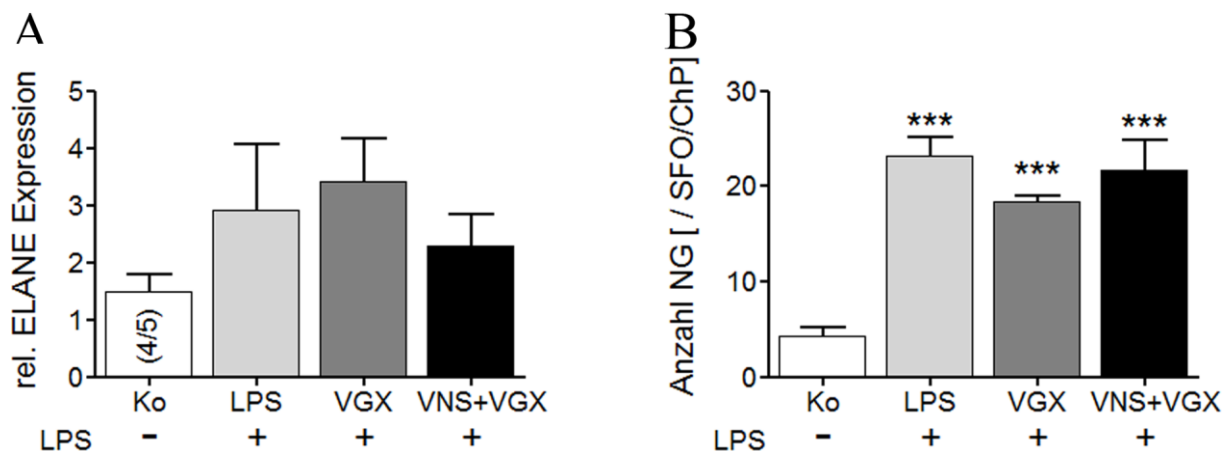


Abbildung 36: Relative Expression von ELANE (A), nachgewiesen mittels PCR im Hypothalamus und die Anzahl an NG (B) im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* nachgewiesen mittels Immunfluoreszenz; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. Die mRNA Expression von ELANE war insgesamt niedrig und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die zusätzlich vagotomierte Gruppe zeigte jedoch eine Tendenz zu einer leicht erhöhten ELANE Expression ($p = 0,09$) verglichen mit der Kontrollgruppe. In der immunhistologischen Untersuchung induzierte LPS eine Erhöhung der Anzahl NG. Hier führte die zusätzliche Vagotomie tendenziell zu einer geringeren Erhöhung der Anzahl NG ($p = 0,10$). Die Unterschiede zwischen den septischen Gruppen erreichten jedoch keine Signifikanz.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, NG = neutrophile Granulozyten, SFO = *Organum subfornicale*, ChP = *Plexus choroideus*, 4/5 = 4 von 5 Proben waren nachweisbar.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$).

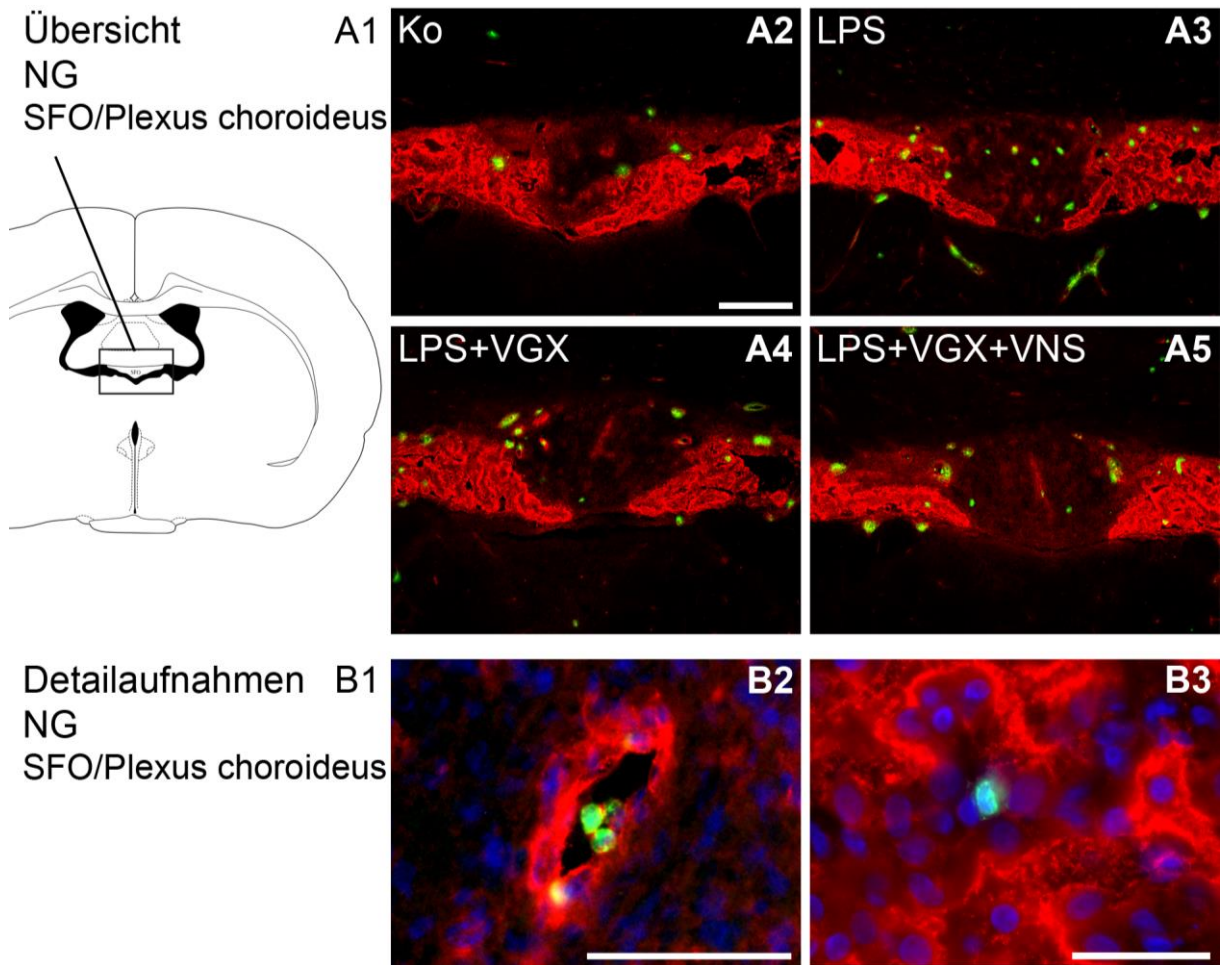


Abbildung 37: Immunhistologischer Nachweis von NG im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* (A2 – A5) und Detailaufnahmen NG im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* (B2, B3); 4,5 Stunden nach LPS Applikation. LPS induzierte eine Zunahme NG, die in der zusätzlich vagotomierten Gruppe tendenziell leicht verringert war ($p = 0,1$). Die Bilder B2 und B3 zeigen Detailaufnahmen von NG, die zumeist in größeren Gefäßen des SFO (B2) oder im Bereich des *Plexus choroideus* (B3) lokalisiert waren. Aufgrund der sehr starken ICAM-1 Expression zeigten nahezu alle NG eine Kolokalisation mit ICAM-1 in dieser Region. Die Detailaufnahmen sind repräsentativ für alle septischen Gruppen. Der Neutrophilenmarker Myeloperoxidase ist in grün dargestellt, ICAM-1 in rot und die Zellkerne mittels DAPI in blau. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 200 μm und gilt für die Bilder A2 – A5 und die Größenmarker in den Bildern B2 und B3 entsprechen 50 μm und 25 μm

Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, NG = neutrophile Granulozyten, SFO = *Organum subfornicale*, ICAM = „intercellular adhesion molecule“.

2.3 Cortex

Der Cortex ist in der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung, da bei den neurophysiologischen Messungen, Prozesse im somatosensorischen Cortex erfasst wurden. Hierbei konnten positive Einflüsse einer zusätzlichen Vagusnervstimulation unter septischen Bedingungen beobachtet werden. Deshalb sollte eine weitere Untersuchung dieser Region die hierbei wirkenden Mechanismen näher beleuchten. Eine zusätzliche Besonderheit des Cortex ist dabei die Trennung von der Peripherie durch die BBB, wodurch sich Unterschiede in der Reaktion auf eine Inflammation ergeben können.

2.3.1 Zytokine

Wie im Hypothalamus auch, wurde im Cortex die mRNA Expression von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-17 und IL-10 mittels PCR bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 graphisch dargestellt.

Dabei zeigten alle untersuchten Zytokine eine LPS bedingte Induktion ihrer Expression. Bei der $\text{TNF}\alpha$ Expression erreichten die Unterschiede zwischen den septische Gruppen keine Signifikanz, eine zusätzliche Vagotomie führte jedoch zu einem tendenziell niedrigeren Anstieg der mRNA Expression verglichen mit der LPS Gruppe ($p = 0,07$). Anders war dies jedoch bei der IL-1 β Expression. Hier bewirkte die zusätzliche Vagotomie eine signifikante Verringerung der LPS bedingten Induktion der IL-1 β Expression verglichen mit der LPS Gruppe. Auch eine zusätzliche Vagusnervstimulation zeigte eine Tendenz zu einer Verringerung des Anstiegs der IL-1 β mRNA Expression ($p = 0,07$) verglichen mit der LPS Gruppe.

Ähnlich wie im Hypothalamus führte eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einer signifikant geringeren Induktion der IL-6 Expression verglichen mit der LPS und der LPS+VGX Gruppe. Die zusätzlich vagotomierte Gruppe zeigte ebenfalls eine leichte Tendenz zu einem verringerten Anstieg der IL-6 Expression verglichen mit der LPS Gruppe ($p = 0,07$).

Die IL-17 Expression im Cortex ähnelte ebenfalls der im Hypothalamus. Sie zeigte eine insgesamt geringe mRNA Expression, wobei alle Proben der Kontrollgruppe unterhalb der Nachweisgrenze lagen. LPS führte zu einem Anstieg der IL-17

Expression, die sich jedoch zwischen den septischen Gruppen nicht signifikant unterschied. Dennoch zeigten sich Unterschiede in der Anzahl der detektierbaren Proben. Während in der LPS und LPS+VGX Gruppe 4 von 5 Proben detektiert werden konnten, waren es in der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe nur 3 von 5 Proben. Die IL-10 Expression war ebenfalls sehr gering. Auch hier konnte IL-10 in keiner Kontrollprobe detektiert werden. LPS bedingte wiederum eine Induktion der IL-10 Expression, diese unterschied sich jedoch zwischen den septischen Gruppen nicht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagotomie zu einer signifikant verminderten LPS bedingten Induktion der IL-1 β Expression führte, während sich bei einer zusätzlichen Vagusnervstimulation hier nur eine Tendenz zeigte ($p = 0,07$). Die Vagusnervstimulation führte jedoch ähnlich wie im Hypothalamus zu einem signifikant geringeren Anstieg der IL-6 Expression verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe.

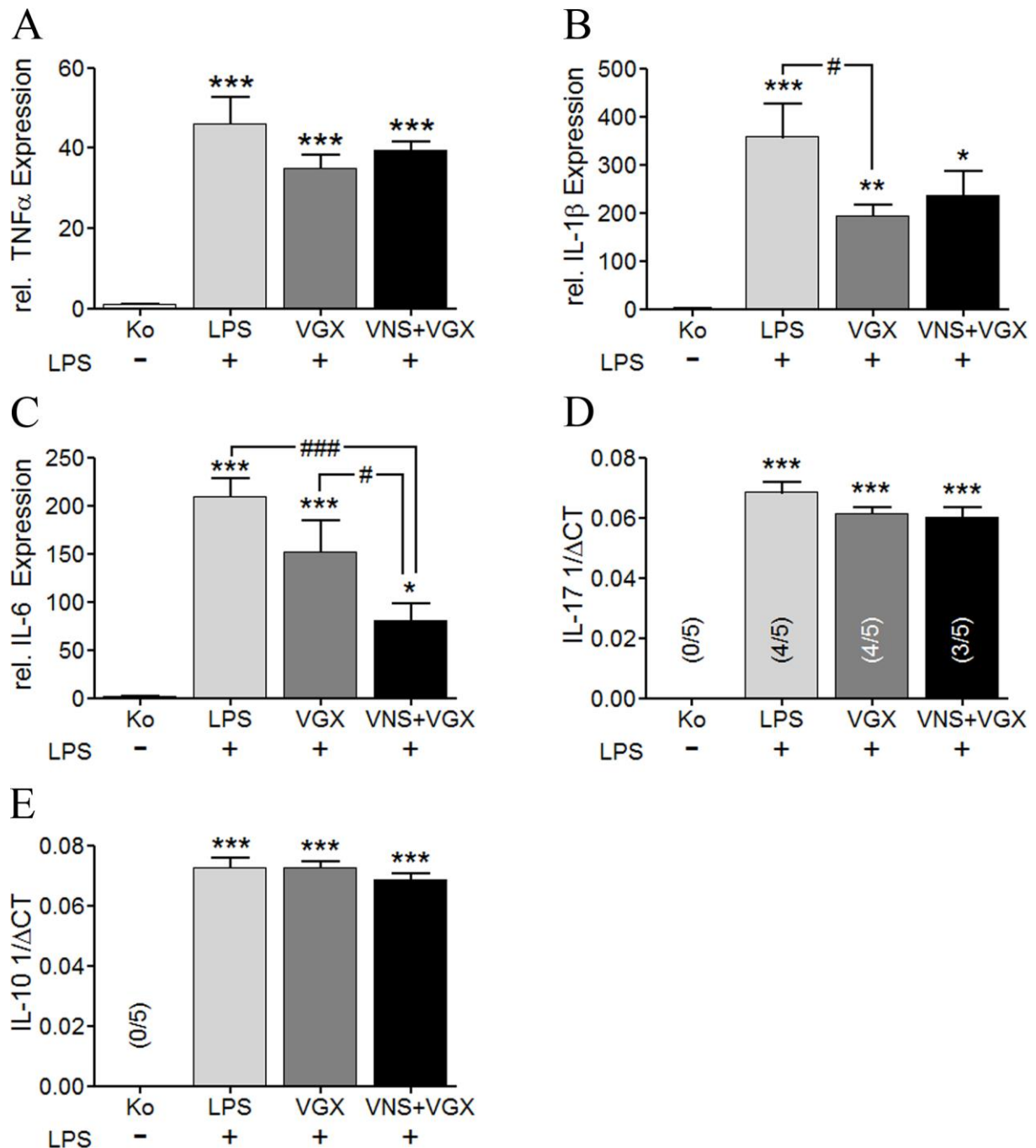


Abbildung 38: Relative Expression von TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-17 (D) und IL-10 (E) im Cortex; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. Alle untersuchten Zytokine zeigten einen LPS induzierten Anstieg ihrer Expression. Die TNF α , IL-17 und IL-10 Expression unterschied sich in den septischen Gruppen nicht. Dahingegen bewirkte eine zusätzliche Vagotomie eine Verminderung der IL-1 β Expression. Ähnlich wie im Cortex führte eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der IL-6 Expression verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ### = $p \leq 0,005$; #### = $p \leq 0,001$).

2.3.2 Transkriptionsfaktoren

Um die genomische Aktivierung im Cortex zu analysieren, wurden die Transkriptionsfaktoren bzw. ihre Inhibitoren I κ B α , SOCS3 und NF-IL6 mittels PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 graphisch dargestellt.

Interessanterweise verhielten sich alle drei untersuchten Transkriptionsfaktoren im Cortex sehr ähnlich. LPS induzierten einen Anstieg der Expression von I κ B α , SOCS3 und NF-IL6. Eine zusätzliche Vagotomie führte zu einer sehr starken Reduktion des LPS bedingten Anstiegs der Expression dieser Transkriptionsfaktoren, die allerdings nicht signifikant von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation beeinflusst wurde. Außerdem wurde zusätzlich eine immunhistologische Untersuchung von NF-IL6 im Cortex durchgeführt, um zu analysieren, ob sich dabei die Änderungen der mRNA Expression bestätigen ließen. Allerdings konnte in keiner der untersuchten Gruppen eine signifikante NF-IL6 Immunreaktivität im Cortex nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung von NF-IL6 im Cortex sind in Abbildung 40 dargestellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagotomie eine signifikante Verminderung der LPS bedingten Induktion der I κ B α , SOCS3 und NF-IL6 Expression im Cortex bewirkte, die durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation jedoch nicht weiter beeinflusst wurde. Immunhistologisch konnte keine signifikante nukleäre NF-IL6 Immunreaktivität im Cortex nachgewiesen werden (lediglich vereinzelt sehr wenige endotheliale Signale).

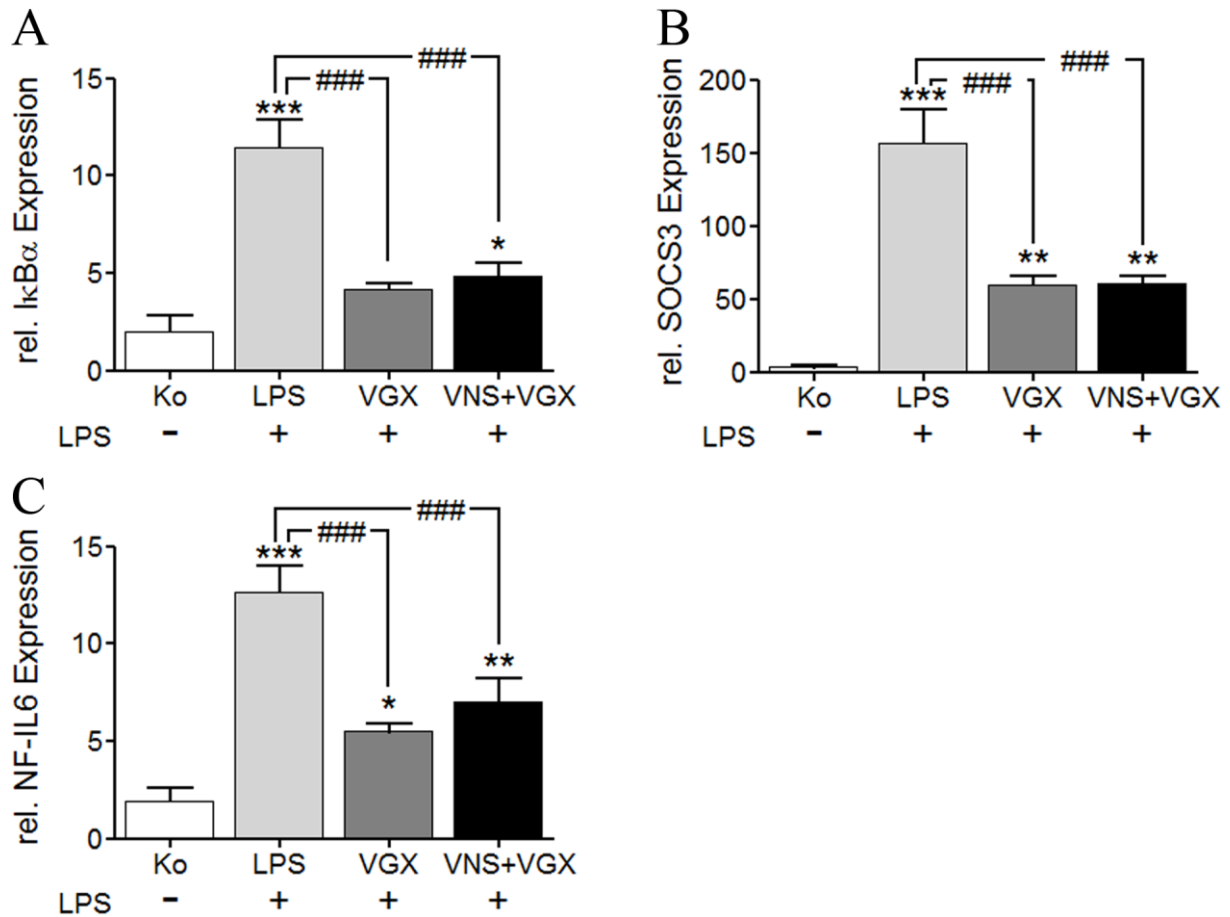


Abbildung 39: Relative Expression von IkB α (A), SOCS3 (B) und NF-IL6 (C) im Cortex; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und Standardabweichung. Auffälliger Weise zeigten die drei untersuchten Transkriptionsfaktoren im Cortex ein sehr ähnliches Verhalten. LPS induzierte einen Anstieg der Expression von IkB α , SOCS3 und NF-IL6 und eine zusätzliche Vagotomie führte zu einer sehr starken Reduktion des LPS bedingten Anstiegs der Expression dieser Transkriptionsfaktoren, die durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation nicht weiter beeinflusst wurde.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, IkB α = inhibitor of κ B α , SOCS = suppressor of cytokine signalling, NF-IL6 = nuclear factor IL-6.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$).

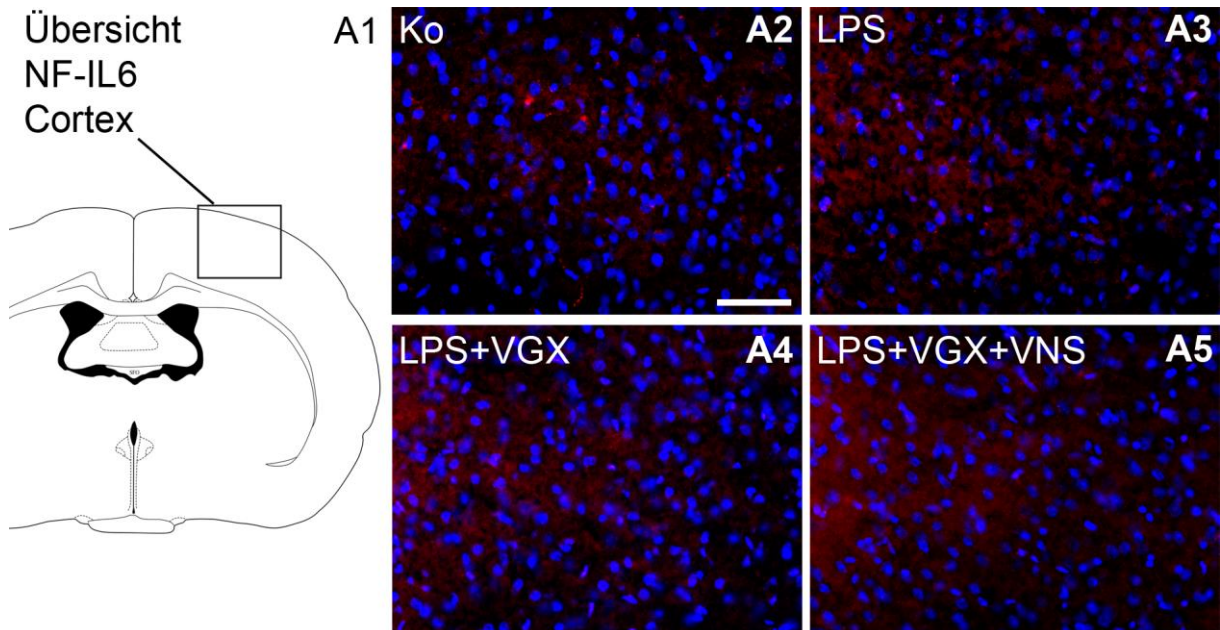


Abbildung 40: Im Cortex (A2 – A5) konnte 4,5 Stunden nach LPS Applikation fast keine nukleäre NF-IL6 Immunreaktivität nachgewiesen werden. NF-IL6 wurde rot angefärbt und Zellkerne mittels DAPI blau. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 50 µm und gilt für die Bilder A2 – A5.

Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, NF-IL6 = nuclear factor IL-6.

2.3.3 Zielgene

Auch im Cortex wurde die COX2 und mPGES Expression mittels PCR untersucht, da diese beiden Enzyme wichtige Faktoren für die Regulation der zerebralen Mikrozirkulation und Zielgene der oben untersuchten Transkriptionsfaktoren darstellen. Die Ergebnisse der COX2 und mPGES PCR sind in Abbildung 41 graphisch dargestellt.

Bei beiden Zielgenen bewirkte LPS einen Anstieg ihrer Expression. Bei COX2 führte jedoch eine zusätzliche Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation zu einer verminderten LPS bedingten Induktion der COX2 Expression. Die mPGES hingegen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei septischen Gruppen. Eine zusätzliche Vagotomie führte hier jedoch tendenziell zu einer geringfügig verminderten Induktion der mPGES Expression ($p = 0,07$).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation zu einer Reduktion der LPS

bedingten Induktion der COX2 Expression im Cortex führte, während sich keine Auswirkungen auf die mPGES zeigten.

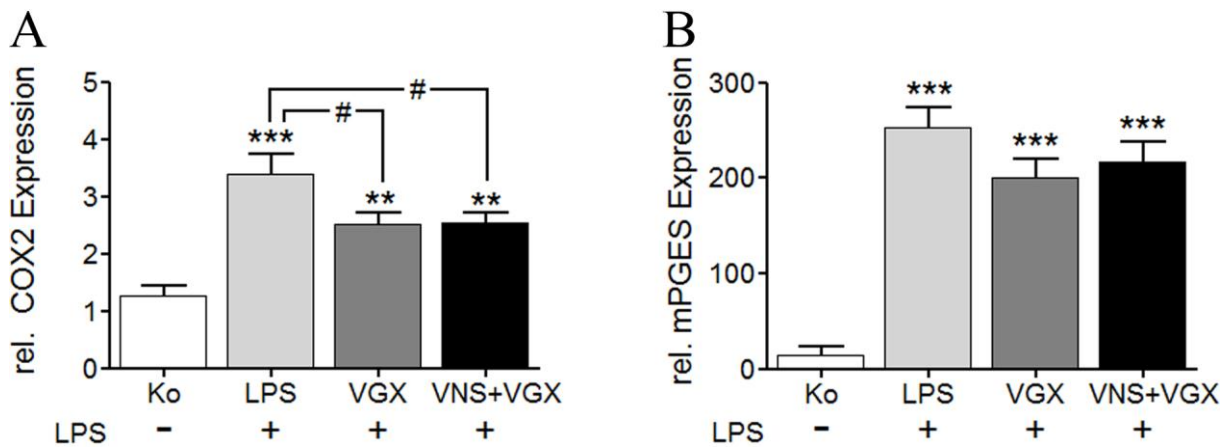


Abbildung 41: Relative Expression von COX2 (A) und mPGES (B) im Cortex; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS bewirkte einen Anstieg der COX2 und mPGES Expression. Während eine zusätzliche Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation zu einer verminderten Induktion der COX2 Expression führte, zeigten sich für die mPGES Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Gruppen.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, COX = Cyclooxygenase, mPGES = mikrosomale Prostaglandin E Synthase. * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$)

2.3.4 T-Lymphozyten und Mikroglia

In den Cortexbereichen, welche für die Auswertung der NG und NF-IL6 Immunreaktivität verwendet wurden, fanden sich nahezu keine T-Lymphozyten. Deshalb erfolgte die Zählung der T-Lymphozyten im Cortex im Bereich des Interhemisphärenspalts auf einer Fläche von etwa 1 mm². Auch dort fanden sich nur wenige T-Lymphozyten, ihre Anzahl wurde durch LPS jedoch erhöht und unterschied sich zwischen den septischen Gruppen nicht signifikant.

Die CD68 Expression zeigte sich in der LPS und LPS+VGX+VNS Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. In der zusätzlich vagotomierten Gruppe zeigte sich allerdings nur eine leichte Tendenz zu einer LPS bedingten Erhöhung der CD68 Expression ($p = 0,13$). In dieser Gruppe zeigte sich außerdem eine signifikant geringere CD68 Expression als in der reinen LPS Gruppe. Die zusätzlich vagusnervstimulierte Gruppe zeigte ebenfalls eine Tendenz zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der CD68 Expression ($p = 0,09$).

Die Anzahl der T-Lymphozyten und die relative Expression von CD68 sind in Abbildung 42 graphisch dargestellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Manipulation des *N. vagus* keine signifikanten Einflüsse auf die Anzahl der T-Lymphozyten nach LPS Applikation im Cortex bewirkte. Bei der CD68 Expression führte eine zusätzliche Vagotomie zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der Expression und eine zusätzliche Vagusnervstimulation zeigte eine ähnliche Tendenz ($p = 0,09$).

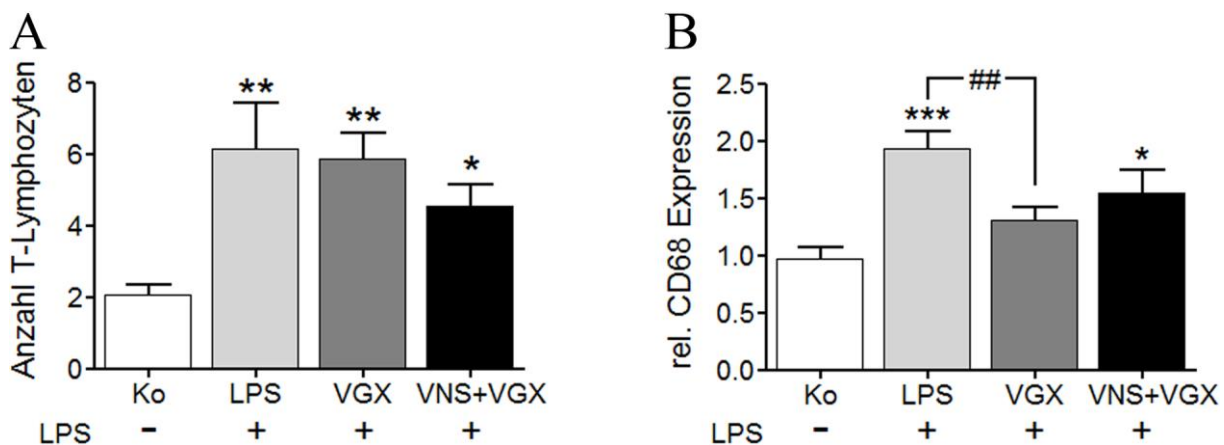


Abbildung 42: Anzahl von T-Lymphozyten (A) im Interhemisphärenspalt des Cortex, nachgewiesen mittels Immunhistologie und die relative CD68 Expression (B) im Cortex, nachgewiesen mittels PCR; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. Die Anzahl von T-Lymphozyten im Cortex war insgesamt niedrig. LPS bewirkte eine Erhöhung der Anzahl an T-Lymphozyten, die sich jedoch zwischen den septischen Gruppen nicht signifikant unterschied. Die CD68 Expression war in der LPS und LPS+VGX+VNS Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, während die zusätzlich vagotomierte Gruppe hier nur eine Tendenz zeigte ($p = 0,13$). Des Weiteren bewirkte die zusätzliche Vagotomie eine signifikant niedrigere CD68 Expression als in der reine LPS Gruppe. Die zusätzlich vagusnervstimulierte Gruppe zeigte hier eine ähnliche Tendenz ($p = 0,09$).

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative. * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$)

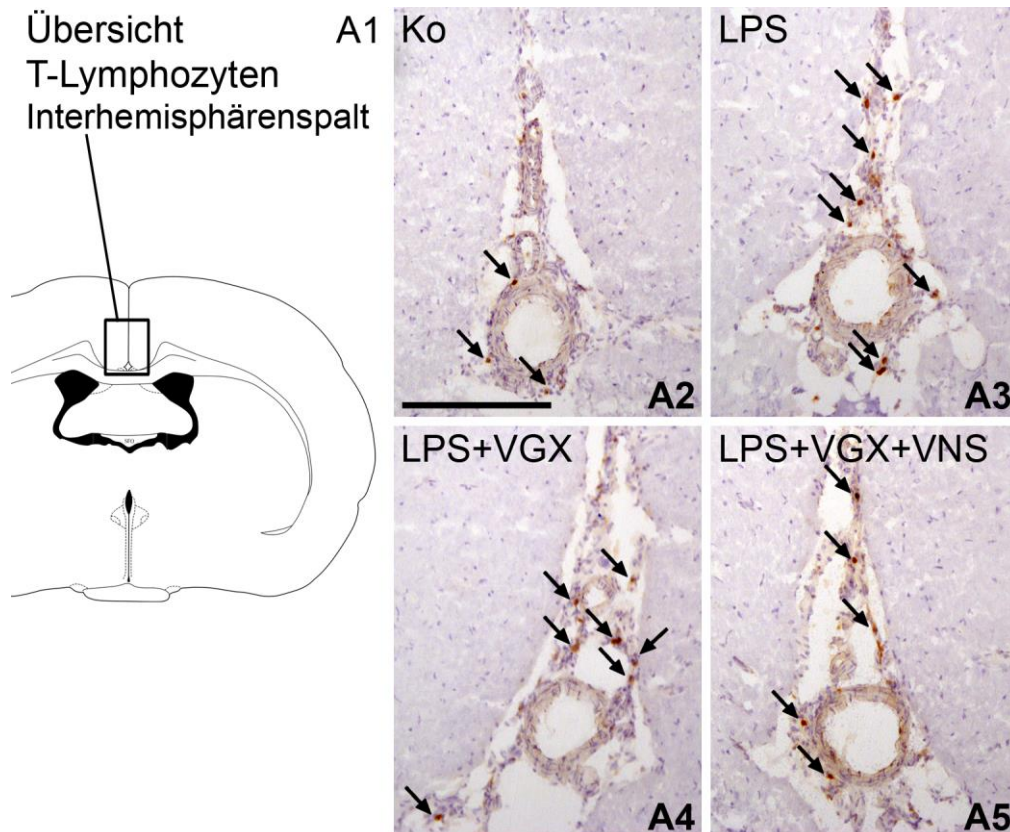


Abbildung 43: Immunhistologischer Nachweis von T-Lymphozyten (braun) (A2 – A5) im Interhemisphärenspalt des Cortex; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Anzahl von T-Lymphozyten im Cortex war insgesamt niedrig. LPS bewirkte eine Erhöhung der T-Lymphozyten Anzahl, die sich jedoch zwischen den septischen Gruppen nicht signifikant unterschied. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 200 µm und ist repräsentativ für die Bilder A2 – A5. LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation.

2.3.5 Faktoren mit Bedeutung für die Adhäsion und Migration von Immunzellen

Wie im Hypothalamus wurde auch im Cortex das Chemokin CXCL1 und das Adhäsionsmolekül ICAM-1 untersucht.

LPS bewirkte einen Anstieg sowohl der CXCL1 als auch der ICAM-1 Expression. Außerdem zeigten beide Mediatoren eine verminderte LPS bedingte Induktion ihrer Expression sowohl nach einer zusätzlichen Vagotomie als auch nach einer zusätzlichen Vagusnervstimulation.

Um zu überprüfen, ob sich diese Unterschiede in der mRNA Expression auch in der ICAM-1 Menge im Gewebe zeigten, wurde zusätzlich eine immunhistologische Untersuchung von ICAM-1 im Cortex durchgeführt. Dabei zeigte sich ebenfalls eine

LPS bedingte Induktion der ICAM-1 Immunreaktivität, allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Gruppen festgestellt werden. Lediglich die zusätzlich vagusnervstimulierte Gruppe zeigte eine Tendenz zu einem geringfügig verminderten LPS bedingten Anstieg der ICAM-1 Immunreaktivität ($p = 0,09$). Somit spiegelten sich die Veränderungen der mRNA Expression in der Immunhistologie nicht wieder.

Die Ergebnisse der CXCL1 und ICAM-1 Expression, sowie der Anteil der ICAM-1 Immunreaktivität an der Gesamtfläche des Schnitts sind in Abbildung 44 graphisch dargestellt. In Abbildung 45 sind zusätzlich die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung dargestellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation zu einer Verminderung des LPS bedingten Anstiegs der CXCL1 und ICAM-1 Expression führte. Im Gegensatz zu den PCR Ergebnissen konnte immunhistologisch jedoch lediglich ein LPS bedingter Anstieg der ICAM-1 Immunreaktivität festgestellt werden, wobei Unterschiede zwischen den septischen Gruppen keine Signifikanz erreichten.

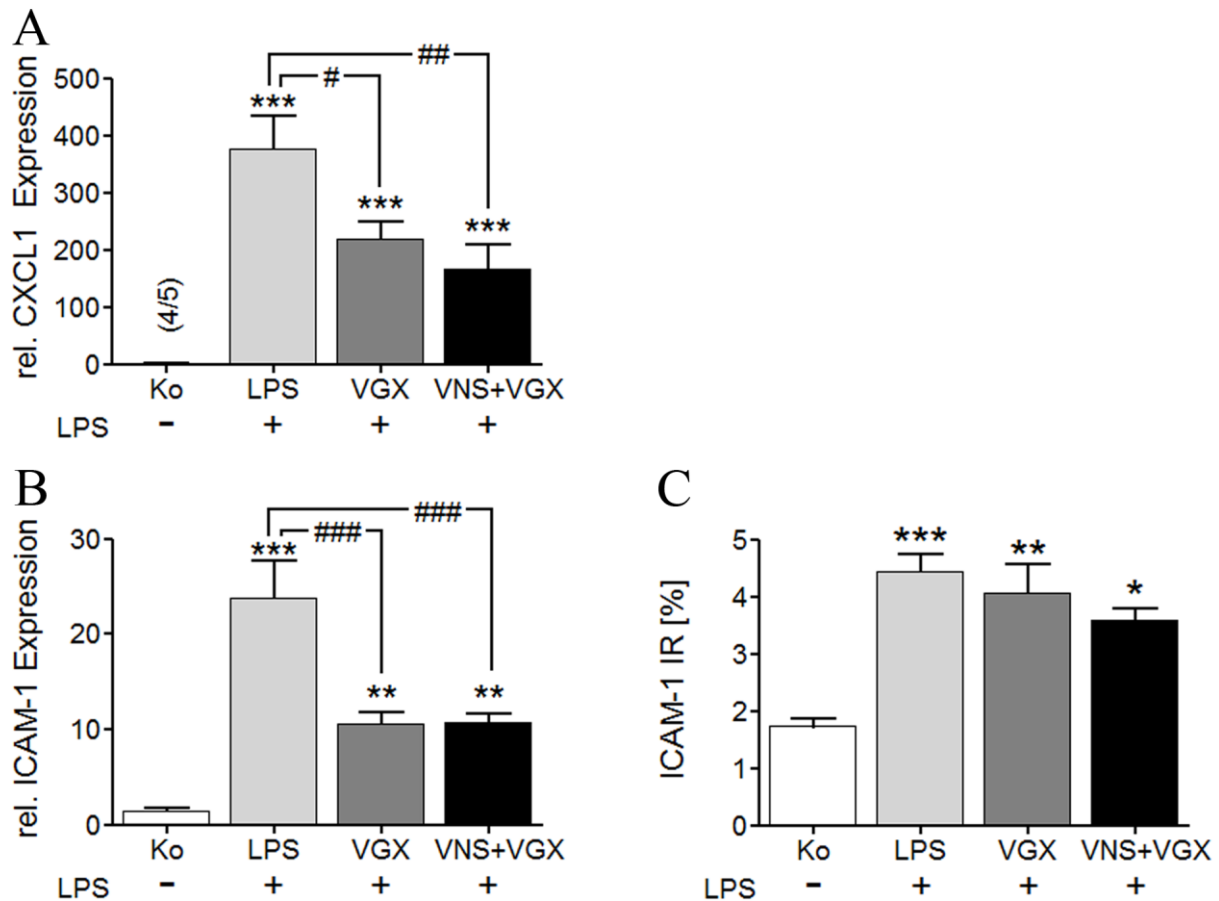


Abbildung 44: Relative Expression von CXCL1 (A) und ICAM-1 (B) bestimmt mittels PCR und die Quantifizierung des immunhistologischen Nachweises von ICAM-1 (C) im Cortex; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS bewirkte eine Induktion der CXCL1 und ICAM-1 Expression, sowie der ICAM-1 Immunreaktivität. Während der LPS bedingte Anstieg der mRNA Expression durch eine zusätzliche Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation vermindert wurde, erreichten Unterschiede zwischen den septischen Gruppen in der immunhistologischen Untersuchung keine Signifikanz. Hier zeigte lediglich die zusätzlich vagusnervstimulierte Gruppe eine leichte Tendenz zu einer verringerten LPS bedingten Induktion der ICAM-1 Immunreaktivität ($p = 0,09$).

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, ICAM = „intercellular adhesion molecule“.

* = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ### = $p \leq 0,005$; #### = $p \leq 0,001$)

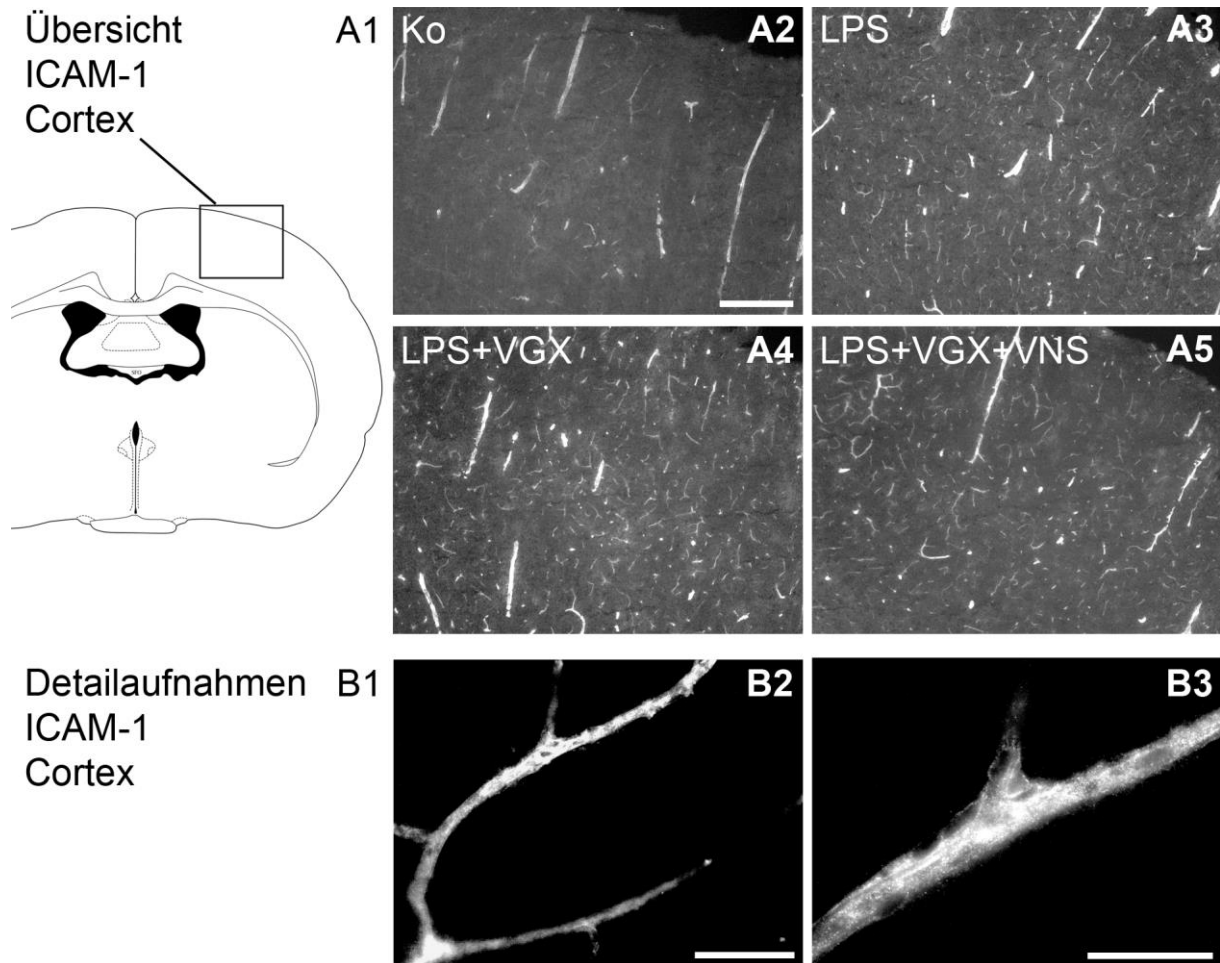


Abbildung 45: Immunhistologischer Nachweis von ICAM-1 im Cortex (A2 – A5) und Detailaufnahmen aus dem Cortex (B2 und B3); 4,5 Stunden nach LPS Applikation. LPS bewirkte eine Induktion der ICAM-1 Immunreaktivität im Cortex, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Gruppen ergaben. Lediglich die zusätzlich vagusnervstimulierte Gruppe zeigte eine leichte Tendenz zu einer verringerten LPS bedingten Induktion der ICAM-1 Immunreaktivität ($p = 0,09$). Bild B2 zeigt eine Detailaufnahme eines ICAM-1 positiven Gefäßes aus dem Cortex, das in Bild 3 vergrößert dargestellt ist. Ähnliche Detailaufnahmen konnten in allen septischen Gruppen beobachtet werden. ICAM-1 ist weiß dargestellt auf schwarzem Grund. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 200 μm und ist repräsentativ für die Bilder A2 – A5 und der Größenmarker in Bild B2 entspricht 50 μm und der in Bild B3 25 μm .

Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, ICAM = „intercellular adhesion molecule“.

2.3.6 Neutrophile Granulozyten

Für die Untersuchung der NG im Cortex wurde zum einen die relative ELANE Expression mittels PCR bestimmt und zum anderen die Anzahl NG immunhistologisch ermittelt. Von besonderem Interesse war hierbei auch eine potenzielle Kolo-kalisation der Immunreaktivität von NG und ICAM-1.

Für die ELANE Expression wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Insgesamt war die Expression jedoch relativ gering und es konnte

lediglich 1 der 5 Kontrollproben detektiert werden. In der LPS Gruppe hingegen waren alle Proben detektierbar und in der LPS+VGX und LPS+VGX+VNS Gruppe jeweils 4 von 5 Proben.

In der immunhistologischen Untersuchung zeigte sich ein starker Anstieg der Anzahl NG im Cortex in allen LPS behandelten Gruppen. Unterschiede zwischen den septischen Gruppen erreichten jedoch keine Signifikanz (LPS+VGX verglichen mit LPS+VGX+VNS: $p = 0,12$).

Interessanterweise ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede in der Kolokalisation NG mit ICAM-1. Dabei induzierte LPS in der LPS und LPS+VGX Gruppe einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils mit ICAM-1 kolokalisierter NG. Die zusätzlich vagusnervstimulierte Gruppe zeigte hier lediglich eine leichte Tendenz zu einer vermehrten Kolokalisation ($p = 0,12$). Des Weiteren war der Anteil mit ICAM-1 kolokalisierter NG in der LPS+VGX+VNS Gruppe im Vergleich mit der reinen LPS und der zusätzlich vagotomierten Gruppe signifikant reduziert.

Die Expression von ELANE, die Anzahl NG und ihre Kolokalisation mit ICAM-1 im Cortex sind in Abbildung 46 graphisch dargestellt. Die Abbildung 47 und die Abbildung 48 zeigen außerdem die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der NG im Cortex und ihrer Kolokalisation mit ICAM-1.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Manipulation des *N. vagus* keine signifikanten Einflüsse auf die ELANE Expression und die Anzahl NG im Cortex nach LPS Applikation ausübte. Interessanterweise bewirkte eine zusätzliche Vagusnervstimulation jedoch eine signifikante Verringerung der Kolokalisation NG mit ICAM-1 verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe.

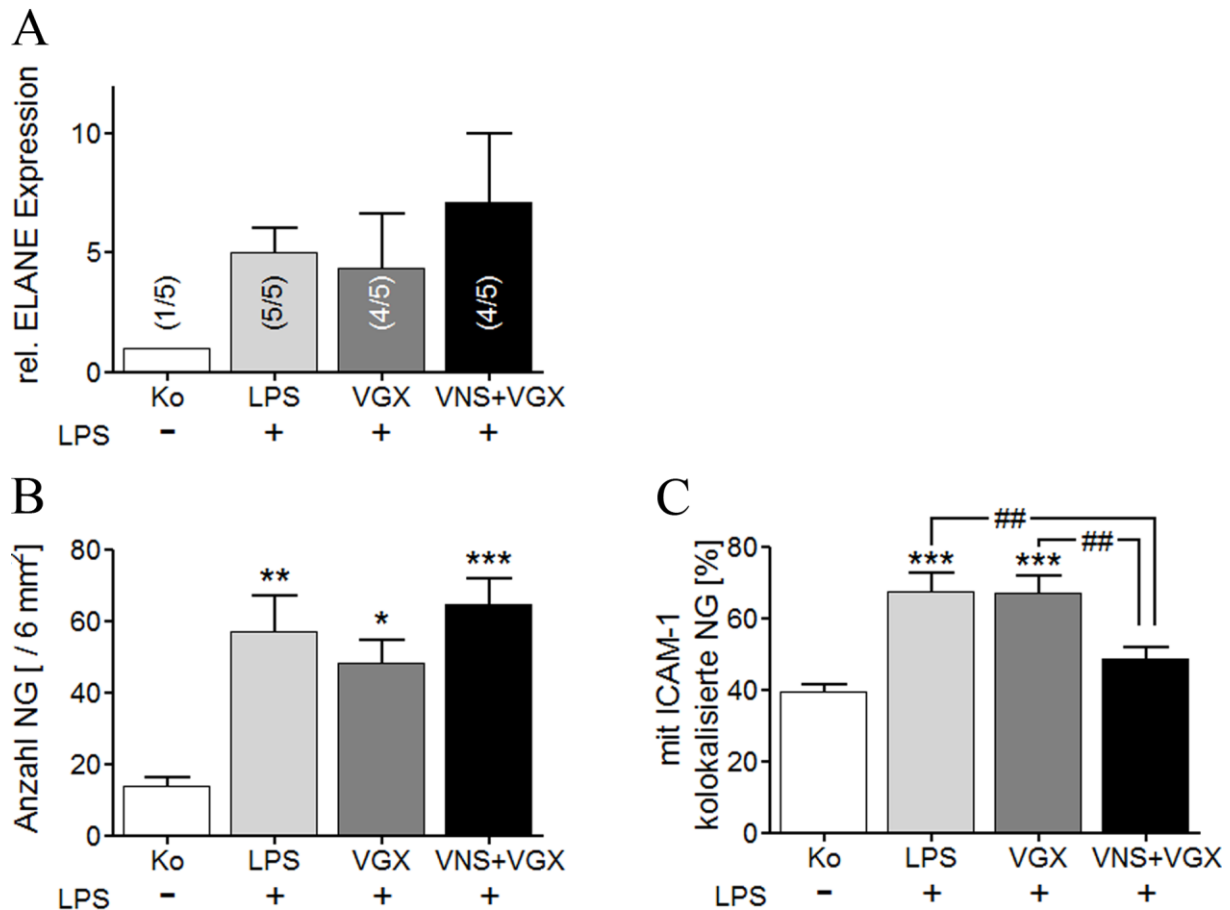


Abbildung 46: Relative ELANE (A) Expression nachgewiesen mittels PCR, Anzahl der NG (B) nachgewiesen mittels Immunhistologie und der Prozentuale Anteil der NG die mit ICAM-1 kolokalisiert (C) sind im Cortex; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von ELANE. Die immunhistologische Untersuchung zeigte jedoch einen starken LPS bedingten Anstieg NG, der sich aber zwischen den LPS behandelten Gruppen nicht signifikant unterschied. Interessanterweise bewirkte eine zusätzliche Vagusnervstimulation eine signifikante Reduktion der Kolokalisation NG mit ICAM-1 verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe.

LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, rel. = relative, ICAM = „intercellular adhesion molecule“, NG = neutrophile Granulozyten. * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$).

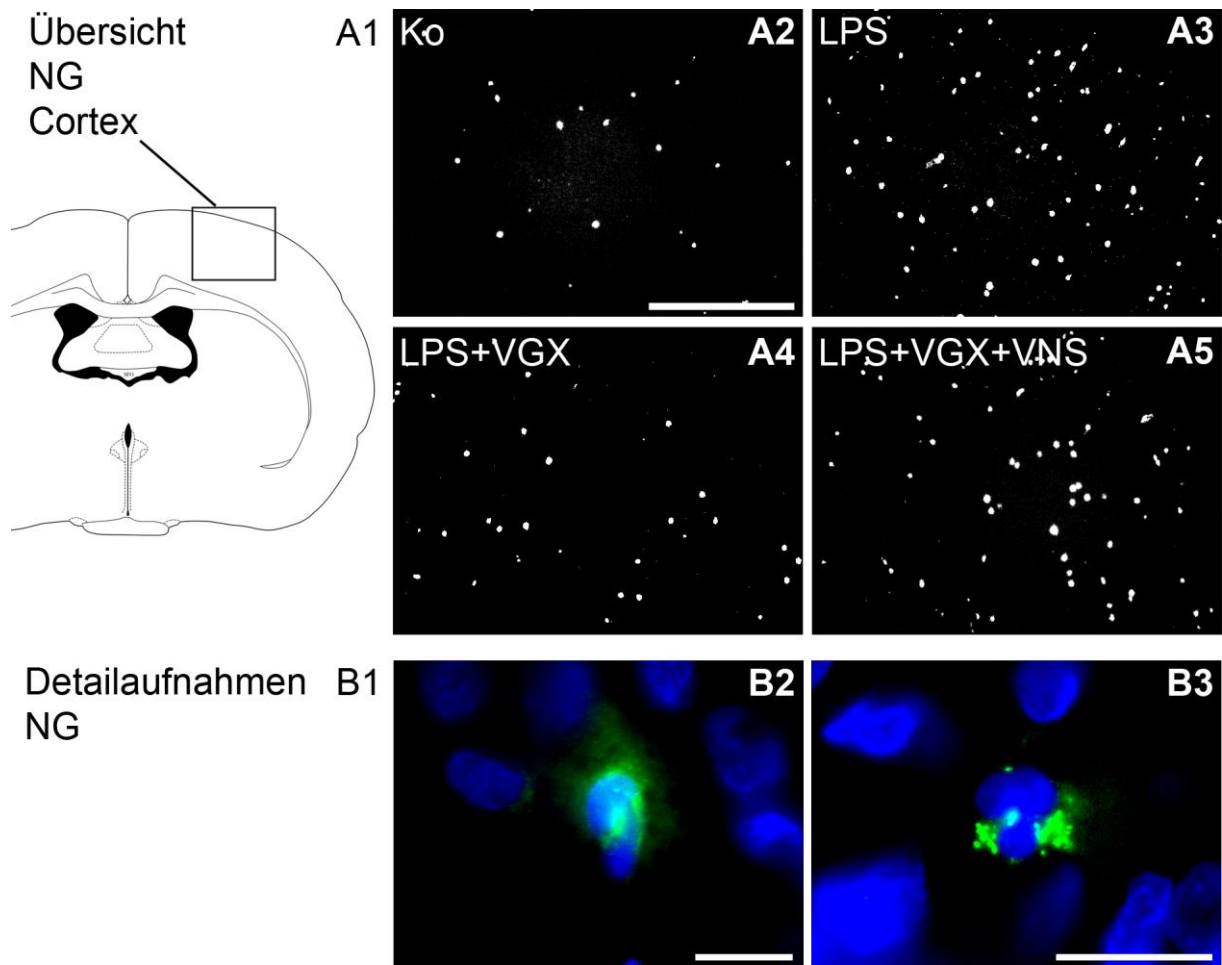


Abbildung 47: Nachweis von NG mittels Immunfluoreszenz im Cortex auf Höhe des SFO (A2 – A5) und Detailaufnahmen von NG im Cortex (B2, B3); 4,5 Stunden nach LPS Applikation. LPS bewirkte einen starken Anstieg der Anzahl NG im Cortex, wobei sich die septischen Gruppen untereinander nicht signifikant unterschieden. NG sind in den Bildern A2 – A5 als weiße Punkte dargestellt. Die Bilder B2 und B3 zeigen Detailaufnahmen eines NG mit einem typischen segmentierten Kern, dargestellt in blau und dem Neutrophilenmarker Myeloperoxidase in grün. Die Detailaufnahmen sind repräsentativ für alle untersuchten Gruppen. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 1000 µm und ist repräsentativ für Bild A2 – A5 und die Größenmarker in Bild B2 und B3 entsprechen jeweils 10 µm. NG = neutrophile Granulozyten, Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation, SFO = *Organum subfornicale*, ChP = *Plexus choroideus*.

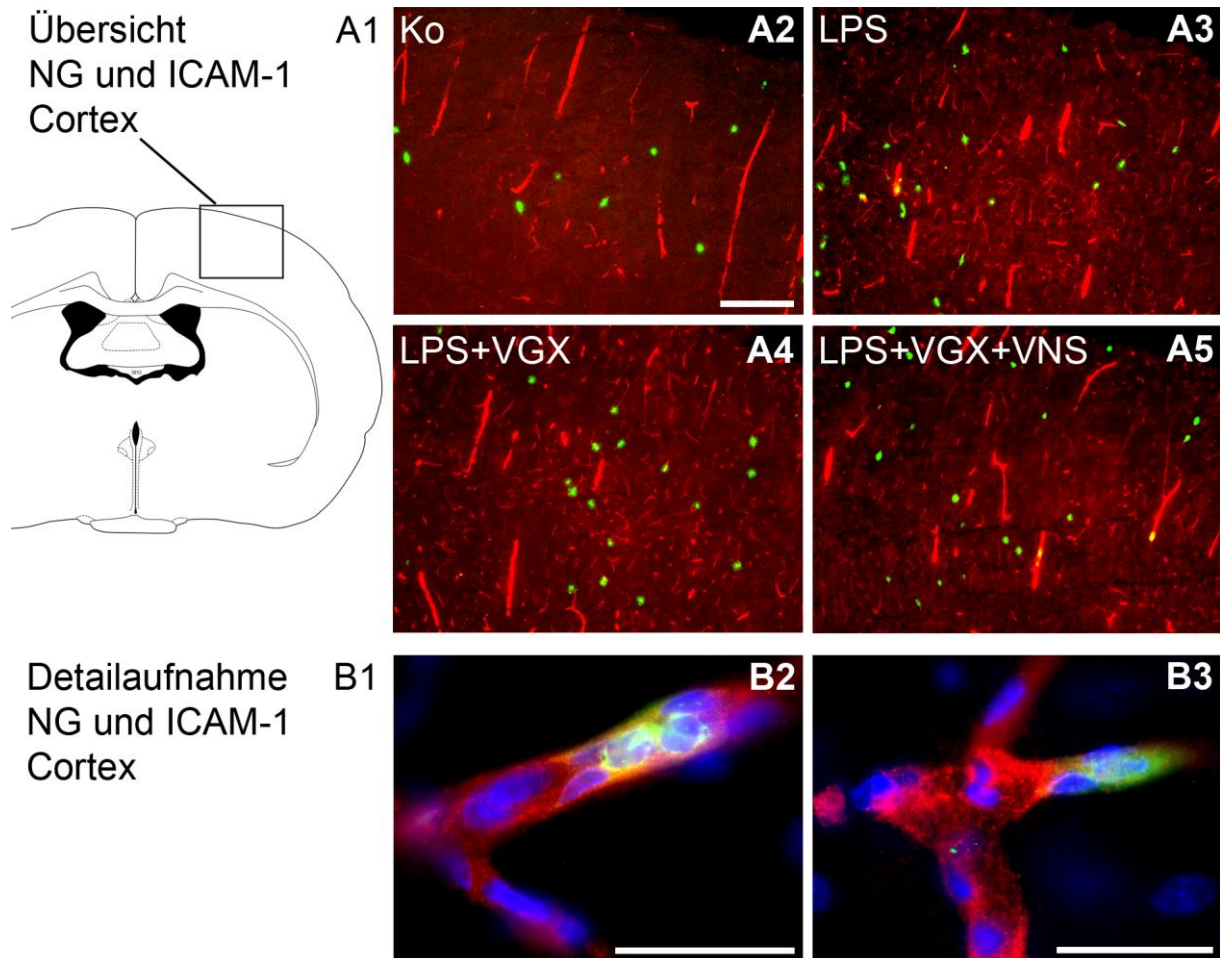


Abbildung 48: Immunhistologische Darstellung der Kolokalisation von NG und ICAM-1 (A2 - A5) und Detailaufnahmen der Kolokalisation (B2 und B3) im Cortex; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. In der LPS und LPS+VGX Gruppe konnte ein signifikant erhöhter Anteil NG, der mit ICAM-1 kolokalisiert war beobachtet werden. Die LPS+VGX+VNS Gruppe zeigte hierbei lediglich eine leicht Tendenz einer erhöhten Kolokalisation ($p = 0,12$). Interessanterweise bewirkte die zusätzliche Vagusnervstimulation eine signifikante Verminderung mit ICAM-1 kolokalisierter NG verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe. Die Bilder B2 und B3 zeigen jeweils Detailaufnahmen eines NG (grün), der eine Kolokalisation mit ICAM-1 (rot) zeigt. Die Detailaufnahmen sind repräsentativ für alle untersuchten Gruppen und unterscheiden sich hier jeweils nur durch ihre Quantität.

ICAM-1 ist rot dargestellt, der Neutrophilenmarker Myeloperoxidase grün und die Zellkerne mittels DAPI blau. Der Größenmarker in Bild A2 entspricht 200 µm und gilt für die Bilder A2 – A5, die Größenmarker in Bild B2 und B3 entsprechen jeweils 25 µm.

NG = neutrophile Granulozyten, Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation.

2.4 Leptin

Leptin ist neben seinen Funktionen im Metabolismus auch an der Modulation der Migration von NG ins Gehirn beteiligt (siehe Kapitel 1 3.1.2). Um weitere Hinweise auf ein verändertes Migrationsverhalten NG zu erhalten wurde deshalb die Plasmakonzentration von Leptin mittels ELISA bestimmt.

LPS bewirkte einen Anstieg der Leptin Plasmakonzentration in allen septischen Gruppen. Eine zusätzliche Vagusnervstimulation führte jedoch zu einem signifikant verminderten Anstieg der Leptin Plasmakonzentration verglichen mit der LPS+VGX Gruppe.

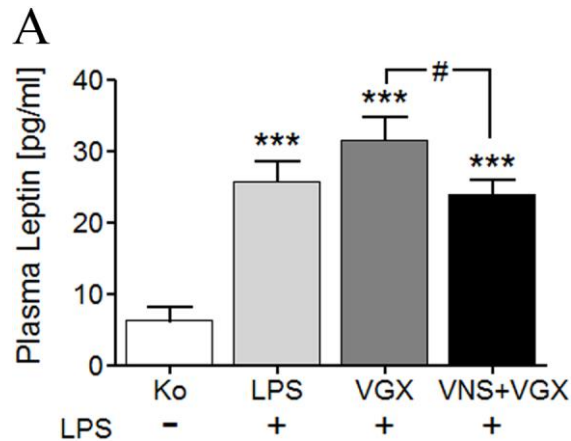


Abbildung 49: Plasmakonzentration von Leptin; 4,5 Stunden nach LPS Applikation. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte und SEM. LPS bewirkte einen Anstieg der Leptin Plasmakonzentration, der durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation im Vergleich zur LPS+VGX Gruppe signifikant vermindert wurde.

Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, VGX = bilaterale Vagotomie, VNS = Vagusnervstimulation. * = verglichen mit Kontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$), # = verglichen wie angegeben (# = $p \leq 0,05$; ## = $p \leq 0,005$; ### = $p \leq 0,001$)

IV. Diskussion

1 Das Tiermodell und der Versuchsablauf

1.1 Das Tier- und Sepsismodell

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Effekte einer Vagusnervstimulation auf die zelluläre Immunantwort im Gehirn setzen das Zusammenspiel mehrerer Organsysteme wie beispielsweise das Nervensystem, die Milz und das Immunsystem voraus. Um diese komplexen Wechselwirkungen untersuchen zu können, müssen sie im physiologischen Verhältnis zu einander stehen, was nur in einem Tiermodell der Fall ist.

Bei der Induktion der Sepsis kann zwischen zwei Strategien unterschieden werden. Bei der ersten wird ein Endotoxin, vornehmlich LPS injiziert, bei der zweiten werden vitale Infektionserreger entweder von außen in den Körper verbracht („peritoneal contamination and infection“ (PCI)) oder endogen freigesetzt („cecal ligation and puncture“ (CLP)). Der Vorteil vitaler Krankheitserreger liegt in ihrer Heterogenität, die eine breit gefächerte Stimulation des Immunsystems hervorruft, während LPS das Immunsystem nur über TLR4 und CD14 aktiviert. Allerdings weist die CLP eine geringe Standardisierbarkeit auf, da zum einen die Menge austretender Mikroorganismen und zum anderen die Art der Mikroorganismen nicht näher bestimmt werden können und diese von Tier zu Tier differieren. Dies und die unbekannte Zeitdauer bis zur Translokation der Mikroorganismen in die Bauchhöhle bedingen eine hohe zeitliche Varianz bis zum Einsetzen der Sepsis Symptomatik und eine hohe Variabilität bezüglich der Ausprägung der Symptomatik [128]. Deshalb wurde in der vorliegenden Untersuchung das LPS-Modell verwendet. Es wurde bereits in mehreren ähnlichen Studien angewendet und erprobt [325, 404, 407] und ermöglicht eine hohe Standardisierung bezüglich des Zeitpunktes, der Dosis und der Wirkung des Endotoxins. Die so gewonnenen Ergebnisse weisen eine hohe Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit auf. Die zeitliche Standardisierung ist außerdem wichtig, da die Erfolgsaussichten einer Therapie bedeutend vom zeitlichen Verlauf abhängig sind und es deshalb wichtig ist, die Versuchsergebnisse bestimmten Zeitpunkten zuordnen zu können.

1.2 Narkose mit Chloralose und Relaxation mit Pancuronium

Die Herausforderung bei der Narkoseführung in der vorliegenden Arbeit lag darin, dass die erfassten neurophysiologischen Parameter durch die Narkose möglichst nicht beeinflusst werden sollten. Deshalb wurde eine Narkose mittels α -Chloralose gewählt. α -Chloralose wird in der Literatur unter anderem als geeignetes Anästhetikum für die Untersuchung des regionalen zerebralen Glukosemetabolismus und des lokalen zerebralen Blutflusses als Reaktion auf die Stimulation der Tastaare oder der Vorderpfote angesehen [68, 297, 505]. Im Gegensatz zu klassischen Anästhetika wie Ketamin oder Benzodiazepinen beeinträchtigt α -Chloralose die Hirnaktivität und Neuronenfunktion nicht und ist somit für die Erfassung der sensorischen Stimulation mittels SEP geeignet [505, 528]. Inhalationsnarkotika wie Isofluran hingegen sind für den vorliegenden Versuch ungeeignet, da sie eine NO stimulierende Wirkung aufweisen und deshalb die Messung der evozierten Flussantwort beeinflussen könnten [302]. Des Weiteren bewirkt Isofluran eine kardiovaskuläre Depression, die bei α -Chloralose nur geringfügig zu beobachten ist [33]. Deshalb wurde eine Auswaschzeit von einer Stunde nach Umstellung der Narkose von Isofluran auf α -Chloralose eingehalten.

Während α -Chloralose Narkosen tritt jedoch eine gesteigerte Reflexantwort auf, die zur Auslösung von Krämpfen führen kann [33]. Zur Unterdrückung dieser Hyperexzitabilität wurde Pancuronium zur Muskelrelaxation verabreicht. Pancuronium wirkt ausschließlich auf die somatische Muskulatur, beugt Chloralose induzierten Krämpfen vor und unterdrückt die Spontanatmung, sodass eine maschinelle Beatmung möglich ist. Es hat jedoch keinen Einfluss auf die glatte Gefäßmuskulatur, sodass die Fähigkeit zur Anpassung des Gefäßtonus erhalten bleibt. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Messung der zerebralen evozierten Flussantwort. Ein Nachteil der α -Chloralose Narkose ist, dass sie schlecht ausschleichbar und nur mangelhaft reversibel ist [33]. Dies war für den vorliegenden Versuch jedoch nicht von Bedeutung, da die Tiere am Ende des Versuchs getötet wurden. Des Weiteren induziert α -Chloralose eine geringgradige Alkalose, die sich in den Versuchsdaten widerspiegelt, den Versuchsverlauf jedoch nicht beeinflusste. Das hier angewendete Narkoseprotokoll wurde in ähnlichen Versuchsanordnungen zur

Messung der SEPs und neurovaskulären Kopplung bereits standardisiert und erfolgreich angewendet [325, 404, 407].

Da nach der Muskelrelaxation eine Überprüfung der Narkosetiefe durch den Zwischenzehenreflex nicht mehr möglich war, wurde stattdessen die Blutdruckreaktion auf ein schmerzhaftes Zwicken des Zwischenzehenbereichs dafür herangezogen.

1.3 Parameter zur Sicherstellung der Stabilität des Versuchsprotokolls

Eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch das angewendete Protokoll oder die Versuchsdauer wurde nach Möglichkeit ausgeschlossen.

So können sich beispielsweise eine Hypothermie oder eine Hypoglykämie negativ auf die neuronale Aktivität auswirken. Deshalb wurde zum einen eine narkosebedingte Hypothermie durch den beheizbaren Tisch vermieden und zum anderen wurde mit der Infusionslösung Glukose substituiert und durch regelmäßige Kontrollen sichergestellt, dass sich der Glukosespiegel im Normbereich befand.

Alle untersuchten Tiere zeigten einen erhöhten Sauerstoffpartialdruck. Dies wurde durch die maschinelle Beatmung mit einem Gasgemisch aus 50 % Sauerstoff und 50 % Stickstoff verursacht. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass der Kohlenstoffdioxidpartialdruck aller Tieren im physiologischen Bereich lag, da eine Hypo- oder Hyperkapnie den zerebralen Blutfluss beeinflussen kann [228]. Während der gesamten Versuchsdauer erhielten die Tiere eine moderate Flüssigkeitszufuhr in Form von Ringerlösung, als Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten durch Evaporation und Miktion. Dies führte in allen untersuchten Gruppen zu einer leichten Abnahme des Hämatokrit.

2 Auswirkungen einer VGX und VGX+VNS auf klinische und neurophysiologische Parameter während einer LPS bedingten Inflammation

2.1 Kreislauf und Metabolismus

Wie in der Literatur beschrieben, führte LPS auch in der vorliegenden Arbeit zu einem Abfall des Blutdrucks in allen septischen Gruppen. Eine Hypotonie, trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution, ist per Definition ein wichtiges Symptom des septischen Schocks [24, 188, 522]. Dabei bewirken proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine eine unausbalancierte Freisetzung vasoaktiver Substanzen, zu denen unter anderem potente Vasodilatoren wie NO und Prostaglandine (PGE₂, PGI₂) gehören. Zusätzlich weist das Gefäßsystem eine Hyporesponsivität gegenüber vasokontraktile Stimuli wie beispielsweise Katecholaminen auf, die bis zu Vasoplegie führen kann [508]. Dabei spielt neben NO vermutlich auch eine vermehrte Öffnung Adenosintriphosphat (ATP) abhängiger Kaliumkanäle und die damit verbundenen Hyperpolarisation der Zellmembran eine Rolle [314]. Letztendlich führen die Vasodilatation und die Vasoplegie zu einem Versacken des Bluts im venösen Schenkel und es kommt zu einer Minderperfusion von Organen und damit verbundenen Organschäden.

Allerdings kommt es bereits vor dem Eintreten einer Makrozirkulationsstörung oder einer venösen Stase zu einer Störung der Mikrozirkulation [404]. Dies resultiert in einigen Organen in einem Wechsel von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel, welcher mit der vermehrten Bildung von Laktat einhergeht. Zusätzlich kann eine Hemmung der Pyruvat Dehydrogenase durch LPS zu einem verminderten Transport von Pyruvat in die Mitochondrien und dadurch zu einer Anhäufung von Pyruvat im Zytoplasma führen, wo es zu Laktat umgewandelt wird. Außerdem tragen auch eine mitochondriale Dysfunktion mit Inhibition des Zitratzyklus, ein reduzierter Leberstoffwechsel und eine verminderte renale Ausscheidung von Laktat zu dessen Anstieg bei [275, 377]. Die Leber- und Nierenfunktion wiederum hängt von einer adäquaten Perfusion ab. Die Laktatkonzentration diente in der vorliegenden Arbeit als Marker für die Schwere der sepsisbedingten Kreislaufdepression und als Anhaltspunkt eines möglichen Therapieerfolgs durch die Vagusnervstimulation [32].

Wie erwartet zeigten alle septischen Gruppen eine ausgeprägte Hypotension und eine signifikant erhöhte Laktatkonzentration. De Song et al. (2008) konnten zeigen, dass eine Stimulation des efferenten Anteils des *N. vagus* zu einer verminderten Hypotension nach CLP in Ratten führte [462]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch lediglich eine Tendenz ($p = 0,09$) zu einer leichten Stabilisierung des Blutdruckes durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation verglichen mit der LPS+VGX Gruppe beobachtet werden. Dahingegen führte die zusätzliche Vagusnervstimulation zu einem signifikant verringerten LPS bedingten Anstieg der Laktatkonzentration verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Vagusnervstimulation durch ihre anti-inflammatorischen Wirkungen auch in der vorliegenden Arbeit die Kreislagsituation positiv beeinflusste.

Die Erhöhung der Konzentration von Laktat- und Wasserstoffionen geht außerdem mit einer metabolischen Azidose einher [254], die sich auch in den Versuchsergebnissen widerspiegelte. So zeigten alle untersuchten Gruppen zunächst eine α -Chloralose bedingte Alkalose, aus der sich jedoch in den septischen Gruppen im Laufe des Versuchs eine Azidose entwickelte. Eine Kompensation der Azidose über die Respiration war im vorliegenden Versuch durch die maschinelle Beatmung nicht möglich.

Der Blutdruck und die Laktatkonzentration sind jedoch nur sehr vage Marker der peripheren Kreislagsituation während einer Sepsis. Deshalb wurde im Folgenden außerdem die zerebrale Mikrozirkulation untersucht.

2.2 Somatosensorisch evozierte Potenziale und die evozierte Flussantwort

Um neben der peripheren Kreislagsituation auch die zerebrale Funktion und Mikrozirkulation untersuchen zu können, wurde eine Messung der SEPs mittels EEG und eine Messung der evozierten zerebralen Durchblutung mittels LDF-Messung durchgeführt.

Die EEG Untersuchung ist dabei eine methodisch sehr einfache und direkte Messung der neuronalen Aktivität, die eine gleichzeitige Erfassung der zerebralen Durchblutung in räumlicher Nähe ermöglicht. Somit konnten hier gleichzeitig Veränderungen in der neurovaskulären Kopplung und der neuronalen Aktivität erfasst werden. Des Weiteren

hat das EEG auch in der klinischen Anwendung Relevanz, da bei der Diagnostik des SAD die EEG Untersuchung als sehr sensitive Methode genutzt wird (siehe Kapitel I 5) [96, 553]. Für die Auslösung neuronaler Aktivität wurde in der vorliegenden Studie eine sensorische Stimulation der Vorderpfote verwendet, da das Hinterbein für die Blutentnahme und Narkoseapplikation genutzt wurde. Die verwendete Technik ist etabliert und wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung der neuronalen Aktivität und neurovaskulären Kopplung angewandt [325, 358, 404-405, 407].

Die LDF-Messung besitzt mit einer Eindringtiefe von 1 mm und einer Messfrequenz von 10 ms eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung [133, 315]. Dies ermöglicht eine kontinuierliche Messung der relativen Änderung der lokalen zerebralen Durchblutung über die Veränderung der Blutflussgeschwindigkeit [130]. Erstmals wurde diese Technik 1975 publiziert [472]. Heute ist sie sehr gut etabliert und weist eine hohe Reproduzierbarkeit auf [20-21, 134-135, 325, 347, 404-405, 407].

Wie auch in vorangegangenen Studien [325, 358, 404, 407, 557] führte LPS in der vorliegenden Arbeit zu einer Reduktion der evozierten zerebralen Flussantwort als Zeichen einer gestörten neurovaskulären Kopplung und zu einer Verlängerung der SEP Latenzen und Reduktion der SEP Amplituden als Zeichen einer gestörten Neuronenfunktion. Eine zusätzliche Vagusnervstimulation konnte jedoch im Gegensatz zu einer zusätzlichen Vagotomie, die Entkopplung der zerebralen Durchblutung verhindern und die SEP Amplituden stabilisieren. Dass eine Vagotomie und Vagusnervstimulation ohne LPS bereits Auswirkungen auf die klinischen und neurophysiologischen Parameter haben könnten, wurde in einer vorangegangenen Studie von Mihaylova et al. (2012) ausgeschlossen [325].

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Störung der Mikrozirkulation zeitlich vor dem Verlust der Neuronenfunktion eintritt [325, 404, 407]. Eine gestörte zerebrale Mikrozirkulation trägt somit wesentlich zum Funktionsverlust von Neuronen bei. Sie bewirkt einen Sauerstoff- und Glukosemangel, der zu einer ATP Verarmung führt. Das Gehirn ist dabei besonders anfällig, da es nicht über ausreichende Substratspeicher verfügt. Eine Minderversorgung führt deshalb rasch zu einem Funktionsverlust der Neurone [212, 556]. Demzufolge ist die hier beobachtete Stabilisierung der SEP Amplituden durch die Vagusnervstimulation

vermutlich auf eine Vagusnerv bedingte Verbesserung der Mikrozirkulation zurückzuführen.

Die evozierte Flussantwort ist somit eine der frühesten und sensitivsten Methoden einen LPS bedingten neuronalen Funktionsverlust zu detektieren oder sogar vorherzusagen. Außerdem stellt die Verbesserung der zerebralen Mikrozirkulation einen möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Therapien des SAD dar.

Dabei ist jedoch noch nicht eindeutig bekannt, wie genau LPS zu einer Entkopplung der bedarfsadaptierten Gehirndurchblutung führt. Es wird jedoch von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Dabei spielt eine gestörte Regulation des Gefäßtonus durch eine verminderte Ansprechbarkeit des Endothels und die unausbalancierte Freisetzung vasoaktiver Substanzen eine wichtige Rolle [117, 121]. Zu diesen gehören unter anderem NO und Prostaglandine, wie PGE₂. Diese tragen physiologischerweise zur Regulation des Gefäßtonus im Gehirn bei, werden jedoch auch durch inflammatorische Stimuli vermehrt freigesetzt. Dies könnte die fein abgestimmte Regulation des Blutflusses aus dem Gleichgewicht bringen (siehe Kapitel I 6.2 und 6.3) [27]. Des Weiteren tragen eine gesteigerte Koagulation, eine geänderte endotheliale Glykokalix, eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand und veränderte Fließeigenschaften des Bluts zu einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation bei [119, 308, 568].

Wie genau eine Vagusnervstimulation die Mikrozirkulation im Gehirn unter septischen Bedingungen stabilisiert, ist jedoch noch unklar. Ein wichtiger Mediator der Mikrozirkulation ist dabei NO. So zeigten iNOS Knockout Mäuse, sowie Wildtypiere nach Applikation des selektiven iNOS Inhibitor l-NIL, eine Reduktion der NO Bildung, verbunden mit einer verminderte LPS bedingte zerebralen Hyperämie und eine Stabilisierung der SEP Amplituden [436]. Mihaylova et al. (2012) konnten jedoch zeigen, dass eine efferente Vagusnervstimulation keine Auswirkungen auf die Nitrit/Nitrat Konzentration im Plasma und die iNOS mRNA Expression im Cortex hatte, während die Proteinexpression von iNOS im Cortex durch die Vagusnervstimulation sogar leicht erhöht war [325]. Die Stabilisierung der Mikrozirkulation scheint deshalb nicht durch eine vagale Modulation von NO zu entstehen, sondern durch andere, noch unbekannte Mechanismen vermittelt zu werden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit einige der möglichen Faktoren untersucht,

welche die Mikrozirkulation beeinflussen können. Dazu gehörten zum einen die COX2 und mPGES Expression, welche Anhaltspunkte auf eine veränderte Prostaglandinfreisetzung lieferten, zum anderen wurden Zytokine und Transkriptionsfaktoren als Marker der Entzündungsreaktion untersucht und es wurde analysiert, ob die Vagusnervstimulation Auswirkungen auf Immunzellen, Adhäsionsmoleküle und Chemokine aufwies. Die Ergebnisse dieser Parameter werden in den folgenden Kapiteln besprochen.

Prinzipiell bestätigten die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse der klinischen und neurophysiologischen Parameter die Resultate vorheriger Studien. So konnten Mihaylova et al. (2012) ebenfalls zeigen, dass eine efferente Vagusnervstimulation zu einer Stabilisierung der evozierten Flussantwort und der SEP Amplituden führte [325]. Allerdings war die Sepsissymptomatik in dieser Studie gemessen an dem Ausmaß der LPS bedingten Hypotension, sowie der Plasmakonzentration von Laktat und Zytokinen deutlich geringer ausgeprägt, obwohl die gleiche LPS Dosis und Tierart verwendet wurde. Unterschiede können sich dabei durch die Verwendung unterschiedlicher LPS Chargen oder eines unterschiedlichen genetischen Hintergrunds der Versuchstiere ergeben.

3 Auswirkungen einer VGX und VGX+VNS auf Faktoren des humoralen Wegs während einer LPS bedingten systemischen Inflammation

3.1 Periphere Zytokine

Als Maß für die periphere Entzündungsreaktion wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6, sowie das anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 im Plasma untersucht.

PAMPs, wie das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte LPS, können die Freisetzung proinflammatorischer (bspw. TNF α , IL-6, COX2, PGE₂, NO) [106, 324, 525] und teilweise auch anti-inflammatorischer Mediatoren (IL-10, IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra), löslicher TNF Rezeptor) [497] induzieren und über diese endogenen Signalsubstanzen zur Entstehung von krankheitsbedingten Verhaltensänderungen, wie Lethargie, Anorexie und Fieber beitragen [114, 274, 410]. Proinflammatorische

Zytokine führen außerdem zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse [215] und der Akuten Phase Reaktion [169]. Des Weiteren bewirken sie auch eine Aktivierung des Endothels verbunden mit einem prokoagulatorischen Status [344] und einer Schädigung der BBB [396]. Zusätzlich geht dies mit einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen [152, 469] und Chemokinen einher und fördert die Einwanderung von Leukozyten [142, 152, 378, 469].

IL-10 hingegen ist als anti-inflammatorisches Zytokin bekannt und hemmt die Bildung proinflammatorischer Mediatoren (bspw. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6) [124, 399], fördert die Bildung anti-inflammatorischer Mediatoren (IL-1ra) [234] und induziert die Apoptose von Lymphozyten [28]. Außerdem reduziert es die Antigenpräsentation auf Makrophagen [124] und wirkt antipyretisch [290].

Wie zu erwarten, führte LPS in der vorliegenden Arbeit zu einer Erhöhung der oben genannten Zytokine. In der Literatur ist bereits bekannt, dass eine Vagusnervstimulation entsprechend des cholinergen anti-inflammatorischen Wegs (siehe Kapitel I 4.2) zu einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine im Plasma führt [71, 310, 498, 565]. Dementsprechend bewirkte eine zusätzliche Vagusnervstimulation auch in der vorliegenden Studie einen signifikant verminderten LPS bedingten Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ Plasmakonzentration verglichen mit der LPS Gruppe und tendenziell auch der LPS+VGX Gruppe ($p = 0,06$).

Die $\text{TNF}\alpha$ Konzentration im Plasma steigt nach einem inflammatorischen Stimulus bereits innerhalb von 60 min an [178]. Somit gehört $\text{TNF}\alpha$ zu den ersten Zytokinen, die bei einer Sepsis induziert werden und spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines septischen Schocks. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse nach Immunisierung gegen $\text{TNF}\alpha$ [50] oder Tumornekrosefaktor Rezeptor I (TNFR I) defiziente Mäuse [375] eine verminderte Krankheitsausprägung nach LPS Applikation zeigten. Klinisch korrelieren stark erhöhte $\text{TNF}\alpha$ Spiegel bei Patienten mit einer Sepsis mit einer erhöhten Mortalität und schlechten Prognose [111, 126, 327]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ zusammen mit IL-1 β an der Entstehung von kognitiven Dysfunktionen nach chirurgischen Eingriffen beteiligt ist [493].

Zusätzlich zeigte sich in der vorliegenden Arbeit neben einer Verminderung der $\text{TNF}\alpha$ Plasmakonzentration auch eine Reduktion des LPS bedingten Anstiegs der IL-6

Plasmakonzentration verglichen mit der LPS Gruppe und tendenziell auch der LPS+VGX Gruppe ($p = 0,10$).

Während eine Vagusnervstimulation die Konzentration peripherer Zytokine vermindert und somit anti-inflammatorische Effekte vermittelt, wird vermutet, dass eine Ausschaltung der physiologischen Vagusnervaktivität durch eine Vagotomie zu einer Verstärkung der inflammatorischen Reaktion führen könnte. Dementsprechend konnte in einigen Studien eine Erhöhung der TNF α Konzentration nach LPS Applikation und Vagotomie beobachtet werden [71, 515]. In anderen Studien konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden [48, 325] und auch in der vorliegenden Studie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der zirkulierenden TNF α oder IL-6 Konzentration zwischen der LPS und LPS+VGX Gruppe.

Anders war dies jedoch für IL-10. Hier zeigte sich nach zusätzlicher Vagotomie eine signifikante Erhöhung der IL-10 Plasmakonzentration verglichen mit der LPS und LPS+VGX+VNS Gruppe. Für IL-10 konnte bisher keine direkte Beeinflussung durch eine Vagusnervstimulation nachgewiesen werden [71, 481]. Da IL-10 im Sinne eines kompensatorischen Mechanismus als negatives Feedback aufgrund einer Inflammation freigesetzt wird, könnte dies ein indirekter Hinweis auf eine erhöhte Inflammation in der zusätzlich vagotomierten Gruppe sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Vagusnervstimulation zu einer Reduktion inflammatorischer Zytokine in der Peripherie führt. Dies bewirkt höchstwahrscheinlich eine verringerte inflammatorische Aktivierung des Gehirns über den humoralen Weg. Doch trotz des anti-inflammatorischen Effekts der Vagusnervstimulation sind die Zytokinkonzentrationen in der vagusnervstimulierten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe immer noch stark erhöht (TNF α : $p = 0,05$, IL-6 $p = 0,01$). Da Zytokine bereits in sehr geringen Konzentrationen biologisch wirksam sind [495], erscheint es fraglich, ob der humorale Weg alleine für den anti-inflammatorischen Effekt im Gehirn und die Stabilisierung der neurophysiologischen Parameter verantwortlich sein kann. Als weitere Kommunikationswege kommen der neuronale Weg in Frage, der vor allem im Cortex von Bedeutung sein könnte und im folgenden Kapitel näher beleuchtet werden soll, und auch der zelluläre Weg, auf den in Kapitel III 4 eingegangen wird.

Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Kommunikationsmechanismen bestehen, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. So konnte beispielsweise vor kurzem gezeigt werden, dass das „Glucagon like peptide-1“ (GLP-1) in Alzheimer [460], LPS [230-231] und Schlaganfall [116] Modellen anti-inflammatorische Wirkungen in Form einer reduzierten TNF α und IL-1 β Konzentration, einem verminderten Verlust hippocampaler Neurone und einer verbesserten Gedächtnisleistung bzw. einer reduzierten Infarktgröße und einer verbesserten neurologischen Funktion bewirkte. Des Weiteren scheint es die Cholin Acetyltransferase und darüber eventuell auch das cholinerge System des Gehirns beeinflussen zu können [460]. Physiologischerweise ist GLP-1 zentral an der Regulation der Nahrungsaufnahme und Hippocampusfunktion beteiligt und wird im *Nucleus tractus solitarius* gebildet [454]. In der Peripherie wird es von L-Zellen des Darms gebildet und dient der Kontrolle des Blutglukosespiegels [139, 322]. Es kann jedoch die BBB passieren [247] und GLP-1 Rezeptoren sind im Gehirn weit verbreitet [323], sodass eine zentrale Beeinflussung durch peripheres GLP-1 möglich ist. Eine Regulation der peripheren GLP-1 Freisetzung durch den *N. vagus* wird derzeit diskutiert [379-380, 395]. Somit könnte neben den bereits bekannten humoralen, neuronalen und zellulären Kommunikationswegen auch ein neuroenteroendokriner Signalweg zwischen der Peripherie und dem Gehirn bestehen. Des Weiteren beschreiben Egea et al. (2015) in einem Review neben dem peripheren cholinergen anti-inflammatorischen Weg auch einen zentralen cholinergen anti-inflammatorischen Weg [143]. Dabei konnten anti-inflammatorische Effekte, wie eine Reduktion der TNF α Expression und eine Neuroprotektion über den $\alpha 7$ nAChR in Zellkulturmodellen für Ischämie [367], der Parkinson Erkrankung [477] und LPS [368, 451], sowie in tierexperimentellen Schlaganfallstudien [367] und globaler Ischämie [190] beobachtet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen Parallelen zu einer zentralen cholinergen anti-inflammatorischen Beeinflussung, die in der folgenden Diskussion mit berücksichtigt werden sollen. Dennoch ist es fraglich, ob und wie im vorliegenden Versuchsaufbau ein cholinerges anti-inflammatorisches Signal aus der Peripherie in das ZNS gelangen könnte.

3.2 Zytokine im Gehirn

Um neben der peripheren Entzündungsreaktion auch die inflammatorische Aktivierung im Gehirn zu untersuchen wurde zusätzlich die mRNA Expression inflammatorischer Zytokine im Gehirn erfasst. Wie zu erwarten, führte LPS zu einer Induktion der Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowohl im Hypothalamus als auch im Cortex [99, 286].

Dabei kann der *N. vagus* aufgrund seiner Afferenzen und Efferenzen unterschiedlich auf die zentrale Inflammation einwirken. Der efferente Anteil des *N. vagus* vermittelt anti-inflammatorische Effekte über den cholinergen anti-inflammatorischen Weg (siehe Kapitel I 4.2) [310]. Der afferente Anteil des *N. vagus* hingegen detektiert inflammatorische Prozesse in der Peripherie und übermittelt diese Informationen an das ZNS (siehe Kapitel I 4.1). Damit vermittelt er proinflammatorische Signale, die beispielsweise zu einer Induktion von krankheitsbedingten Verhaltensänderungen führen [58, 115]. Diese afferente Wirkung kann jedoch durch eine Vagotomie ausgeschaltet werden. Layé et al. (1995) und Hansen et al. (1998) konnten zeigen, dass eine subdiaphragmatische Vagotomie einen LPS oder IL-1 β bedingten Anstieg der IL-1 β Expression im Hippocampus und Hypothalamus verminderte, wobei dieser Effekt unabhängig von der peripheren IL-1 β Expression war. [195, 285]. Die afferente Wirkung des *N. vagus* wird jedoch, vor allem bei einer höheren Endotoxin Dosis, von humoralen Faktoren so stark überlagert, dass sie dann nur noch schwer nachweisbar ist. [193].

In der vorliegenden Studie wurde sowohl der Hypothalamus, als auch der Cortex untersucht. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass der Hypothalamus in direktem Kontakt zu einer Reihe von CVOs mit unvollständiger BBB steht. In diesen Regionen können inflammatorische Mediatoren aus der Peripherie unmittelbar einwirken und eine entsprechende proinflammatorische Antwort auslösen [412] (siehe Kapitel I 2.1.2). Der Cortex hingegen ist durch die BBB zunächst vor einer direkten Zytokineinwirkung abgeschirmt und eine inflammatorische Aktivierung findet bei intakter BBB erst verzögert über Transportsysteme oder indirekt über die Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren in den CVOs, dem Endothel, dem *Plexus choroideus* und perivaskulären Zellen statt. Die einzige schnelle Aktivierung erfolgt über den afferenten parasympathischen Weg [115] (siehe Kapitel I 2.1.1 und 2.1.2).

Aufgrund der Vagotomie ergibt sich deshalb eine dissoziierte Antwort. In den Tieren der LPS Gruppe kommt es zu einer Inflammation im Cortex, die durch eine zusätzliche Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation reduziert wird. Der Unterschied in der systemischen Entzündung der LPS+VGX und der LPS+VGX+VNS Gruppe fällt dabei nicht ins Gewicht. Im Hypothalamus hingegen überwiegt die direkte Beeinflussung durch humorale Faktoren, sodass hier anti-inflammatorische Effekte einer Vagusnervstimulation vermittelt werden. Dies hängt sowohl vom Zeitpunkt der Untersuchung, als auch von der Intaktheit der BBB ab. Rosengarten et al. (2008) zeigten in einer Magnetresonanztomographie Untersuchung, dass 3,5 Stunden nach LPS Applikation in Ratten kein erhöhter Wassergehalt im Gehirn und keine Hinweise auf ein Ödem gefunden werden konnten [406]. Dies weist darauf hin, dass die BBB zu diesem Zeitpunkt noch intakt war. Da in der vorliegenden Arbeit die gleiche LPS Dosis und Tierart verwendet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass auch hier eine intakte BBB vorlag.

Dementsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit im Cortex, nicht aber im Hypothalamus, eine Reduktion der Zytokinexpression durch eine zusätzliche Vagotomie beobachtet werden. So zeigte sich in der LPS+VGX Gruppe eine signifikante Reduktion der IL-1 β Expression verglichen mit der reinen LPS Gruppe. Auch die zusätzlich vagusnervstimulierte Gruppe zeigte eine Tendenz ($p = 0,07$) zu einer verringerten IL-1 β Expression im Cortex, die jedoch wahrscheinlich bereits durch die Vagotomie vermittelt wurde.

Des Weiteren bewirkte die Vagotomie eine Tendenz zu einem verminderten LPS bedingten Anstieg der TNF α und IL-6 Expression ($p = 0,07$), die ebenfalls nur im Cortex zu beobachten war.

Auswirkungen einer Vagusnervstimulation auf die Zytokinexpression im Gehirn konnten in Studien von Jiang et al. (2014) beobachtet werden. Dabei bewirkte die Stimulation des intakten *N. vagus* in einem Ischämie/Reperfusions Modell eine verminderte TNF α , IL-1 β und IL-6 Konzentration in der Penumbra 24 Stunden nach Induktion der Ischämie [237-238, 542]. Auch Zhou et al. (2014) erzielten ähnliche Ergebnisse in einem traumatischen Kaninchenmodell mit der Stimulation des vagotomierten *N. vagus* [569]. Eine ähnliche Reduktion von Zytokinen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur für IL-6 im Cortex und Hypothalamus beobachtet

werden. Allerdings zeigt eine vergleichende Betrachtung der genannten Studien mehrere maßgebliche Unterschiede. So verwendeten Jiang et al. (2014) eine Ischämie und Zhou et al. (2014) ein Hirntrauma zur Induktion einer Inflammation [238, 569]. Beides stellt eine direkte Schädigung des Hirngewebes dar, während in der vorliegenden Studie systemisch appliziertes LPS zur Induktion einer Entzündung verwendet wurde. Auch der Zeitpunkt der Messung war mit 4,5 Stunden in der vorliegenden Arbeit und 24 Stunden in den oben genannten Studien unterschiedlich. Zusätzlich unterschied sich auch die Messmethode. Während hier eine PCR Untersuchung durchgeführt und damit die mRNA Expression der Zytokine bestimmt wurde, verwendeten Jiang et al. (2014) und Zhou et al. (2014) einen ELISA und ermittelten so die vorliegende Proteinkonzentration, die auch durch posttranslationale Veränderung beeinflusst werden könnte. Die Unterschiede in den Ergebnissen können sich daher durchaus durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen begründen.

Von Bedeutung ist dies auch für die Ergebnisse der TNF α Expression im Gehirn. Obwohl die TNF α Plasmakonzentration durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation verringert wurde, ergab sich kein Unterschied hinsichtlich der zerebralen mRNA Expression von TNF α in den drei Sepsisgruppen. Diesen scheinbaren Widerspruch konnten Sun et al. (2013) jüngst auflösen. Nikotin führte in LPS stimulierten Makrophagen zu einer Reduktion der TNF α Proteinkonzentration, nicht aber zu einer Änderung ihrer mRNA Expression [71, 481]. Als Ursache für diesen Effekt beschrieb die Arbeitsgruppe den folgenden Mechanismus: Nikotin induziert über $\alpha 7$ nAChR auf Makrophagen die Expression der Mikro RNA miR-124, die das „tumor necrosis factor-alpha converting enzyme“ (TACE) hemmt, welches Pro-TNF α in aktives TNF α umwandelt. Dadurch kommt es zu einer Reduktion von TNF α trotz erhöhter mRNA Expression. Es konnte nachgewiesen werden, dass die miR-124 auch im Gehirn exprimiert und durch Nikotin reguliert wird [481]. Dieser Mechanismus könnte somit auch in der vorliegenden Arbeit für die scheinbare Diskrepanz zwischen TNF α -Expression im Gehirn und TNF α -Freisetzung in der Peripherie verantwortlich sein.

Im zeitlichen Verlauf einer Sepsis folgt IL-6 auf TNF α und IL-1 β und wird unter anderem im Rahmen einer Zytokinkaskade durch sie induziert [511]. Im Gehirn sind Endothelzellen, Astrozyten, Neurone und Mikroglia die wichtigsten IL-6 produzierenden Zellen [81, 164, 306] und gleichzeitig auch die wichtigsten IL-6

responsiven Zellen. Bei einer Sepsis korreliert die IL-6 Konzentrationen mit ihrem Schweregrad, dem Auftreten von Organdysfunktionen und der Prognose [246, 337, 393]. Allerdings ergaben Versuche, IL-6 im Rahmen einer Sepsis zu blockieren, kontroverse Ergebnisse. So konnten Barkhausen et al. (2011) zeigen, dass die Blockade des löslichen IL-6 Rezeptors zu einer erhöhten Überlebensrate in Mäusen nach „cecal ligation and puncture“ (CLP) führte [38]. Eine andere Studie hingegen zeigte eher protektive Effekte von IL-6 nach Induktion eines septischen Schocks durch LPS und Galactosamin Applikation [39].

Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildung 50), beschrieben Sun et al. (2013) eine nikotinbedingte Reduktion der IL-6 mRNA Expression und Proteinkonzentration in Makrophagen. Die Autoren erklärten dies über eine Induktion der miR-124 und einer Regulation des Transkriptionsfaktors STAT3 (siehe Kapitel III 3.3) [481]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein robuster Einfluss der zusätzlichen Vagusnervstimulation auf die IL-6 mRNA Expression nachgewiesen werden. Hier bewirkte die Vagusnervstimulation eine signifikante Reduktion der IL-6 Expression verglichen mit der LPS und LPS+VGX Gruppe im Cortex, sowie verglichen mit der LPS Gruppe und tendenziell ($p = 0,07$) auch der LPS+VGX Gruppe im Hypothalamus. Dies kann in diesem Fall nicht auf die Auswirkung einer Vagotomie zurückgeführt werden, da die LPS+VGX Gruppe keine signifikante Verminderung der IL-6 Expression aufwies. Zusätzlich zeigten sich ähnliche Veränderungen auch in der IL-6 Plasmakonzentration. Dies liefert einen Hinweis auf eine anti-inflammatorische Wirkung der Vagusnervstimulation, die sich sowohl zentral als auch peripher widerspiegelt und durch eine Regulation von Transkriptionsfaktoren entstehen könnte. Auf eine Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren durch die Vagusnervstimulation soll in Kapitel III 3.3 weiter eingegangen werden.

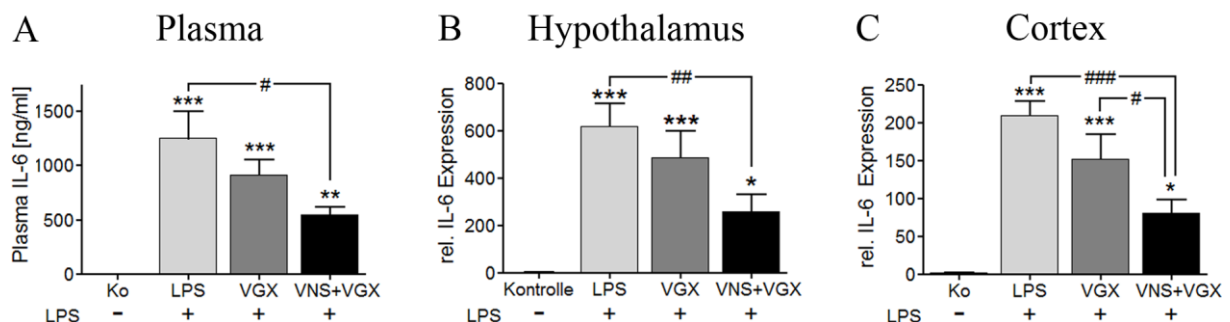


Abbildung 50: Eine zusätzliche Vagusnervstimulation bewirkte einen verminderten LPS bedingten Anstieg der IL-6 Plasmakonzentration (A) und eine reduzierte Induktion der IL-6 Expression im Hypothalamus (B) und Cortex (C) verglichen mit der LPS Gruppe bzw. der LPS und LPS+VGX Gruppe.

Des Weiteren bewirkte eine zusätzliche Vagusnervstimulation im Hypothalamus eine signifikante Reduktion des Anstiegs der IL-10 Expression. Das anti-inflammatorische IL-10 wird im Sinne eines kompensatorischen Mechanismus als negatives Feedback aufgrund einer Inflammation freigesetzt. Bei einer verminderten Entzündungsreaktion sollte somit auch die kompensatorische IL-10 Expression sinken. Außerdem wurde bisher keine direkte Beeinflussung von IL-10 durch den cholinergen anti-inflammatorischen Weg beschrieben [71, 481]. Deshalb könnte dies ein indirekter Hinweis auf eine anti-inflammatorische Wirkung des *N. vagus* sein.

Zur Zytokinfamilie von IL-17, welche erst seit den 90er Jahren bekannt ist [549], gehören IL-17A bis IL-17F, wovon IL-17A das bedeutendste zu sein scheint. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb auf IL-17A eingegangen, welches im Folgenden als IL-17 bezeichnet wird.

IL-17 wird von T-Helferzellen (Th) Zellen gebildet aber auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen, natürlichen Killer T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen und im Gehirn durch Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten [73, 82, 227, 442]. Welche Bedeutung die einzelnen Zelltypen für die IL-17A Produktion haben, ist nicht eindeutig und scheint auch von der jeweiligen Erkrankung abzuhängen [227]. IL-17 wirkt proinflammatorisch und induziert die Expression zahlreicher Zytokine [163, 239, 442], Chemokine [244, 442] und anderer Effektormoleküle [294, 442]. Von besonderer Bedeutung ist die Modellierung NG durch IL-17. Dabei fördert IL-17 die Differenzierung NG aus Vorläuferzellen und ihre Aktivierung [165]. Des Weiteren ist es durch die Induktion von Chemokinen und ICAM-1 [550] wichtig für die Rekrutierung und Migration NG [227]. So konnte gezeigt werden, dass eine Injektion von IL-17 i.p. über die Induktion von Chemokinen zu einem Influx NG in die Bauchhöhle von Mäusen führte [165, 539].

Klassischerweise ist IL-17 für seine Beteiligung an einer ganzen Reihe von Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, der ulcerativer Colitis, der systemischen Vaskulitis, der Psoriasis, der rheumatoiden Arthritis, der experimentellen

autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) bzw. Multiple Sklerose (MS), dem systemischen Lupus erythematosus, Asthma und der Behçets Erkrankung bekannt [227, 442].

IL-17 ist jedoch auch an der Pathogenese der Sepsis beteiligt, wobei seine Bedeutung dabei kontrovers diskutiert wird. So fanden Bosmann et al. (2012), dass die Neutralisierung von IL-17 mittels Antikörpern zu einer reduzierten Mortalität von Mäusen nach i.p. Injektion von LPS führte [72]. Auch in einem CLP Modell konnte eine reduzierte Mortalität verbunden mit einer verminderten systemischen Konzentration proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in Mäusen festgestellt werden [161]. Erstaunlicherweise trat dieser Effekt ebenfalls auf, wenn mit der Neutralisation von IL-17 erst zwölf Stunden nach Sepsisinduktion begonnen wurde. Andere Arbeitsgruppen berichteten jedoch von einer erhöhten Mortalität nach Induktion einer Sepsis durch CLP in Mäusen mit einer Defizienz des IL-17 Rezeptors [165] und in IL-17 Knockout Mäusen [357]. Dies war verbunden mit einer verminderten Rekrutierung NG in die Bauchhöhle und einer erhöhten Bakterienzahl in der Bauchhöhle und im Blut. Des Weiteren konnte für den Menschen gezeigt werden, dass eine bestimmte Variation des IL-17A Gens mit einer erhöhten Anfälligkeit für gram positive Infektionen und einer erhöhten Sterblichkeit bei Sepsis einhergeht [341]. In der vorliegenden Arbeit war die IL-17 Expression sowohl im Cortex als auch im Hypothalamus sehr niedrig. Deshalb ist ihre Auswertung aus technischen Gründen sehr ungenau und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Lediglich die Anzahl der Proben, in denen IL-17 detektiert werden konnte, unterschied sich zwischen der LPS und LPS+VGX Gruppe, in denen 4 von 5 Proben detektierbare Mengen an IL-17 mRNA enthielten, und der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe, in der nur bei 3 von 5 Proben IL-17 detektierbar war. Dies könnte unter Umständen auf eine Beeinflussung der IL-17 Expression durch die Vagusnervstimulation hinweisen. Da IL-17 unter anderem wichtig für die Migration NG ist [446], könnte dies auch zu den weiter unten besprochenen Änderungen der NG beitragen. Um dies zu klären, müssten jedoch weitere Untersuchungen eventuell auch zu anderen Zeitpunkten durchgeführt werden.

Insgesamt ist die Beurteilung der Zytokinantwort im Gehirn aufgrund der vielen unterschiedlichen Faktoren, die sich gegenseitig überlagern und beeinflussen jedoch

komplex. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass es aufgrund der verminderten IL-6 Expression Hinweise auf eine anti-inflammatorische Wirkung einer Vagusnervstimulation im Gehirn gibt. Eine insgesamt verminderte inflammatorische Reaktion im Gehirn kann zu den positiven Effekten der Vagusnervstimulation auf die neurophysiologischen Parameter beitragen.

3.3 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren wurden als Marker einer inflammatorischen Zellaktivierung im Hypothalamus und Cortex analysiert. Sie stellen außerdem einen möglichen Ansatzpunkt für die regulatorische Wirkung des *N. vagus* dar. Bislang wurde die Wirkung einer Vagusnervstimulation oder cholinerg Agonisten überwiegend in der Peripherie untersucht, sodass wenig über die cholinerge Regulation zentraler Transkriptionsfaktoren bekannt ist.

Insgesamt bewirkte LPS, wie zu erwarten, einen Anstieg der mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren bzw. ihrer Inhibitoren I κ B α , SOCS3 und NF-IL6 im Cortex und Hypothalamus. Erstaunlicherweise bewirkte im Cortex eine zusätzliche Vagotomie, unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation eine sehr starke Reduktion der LPS bedingten Expression von I κ B α , SOCS3 und NF-IL6. Dies ist vermutlich wie bei den Zytokinen auch auf eine Unterbrechung der proinflammatorischen Wirkung des afferenten Vagus durch die Vagotomie zurückzuführen (siehe Kapitel III 3.2). Doch trotz der Verminderung inflammatorischer Transkriptionsfaktoren durch eine Vagotomie, konnte eine Stabilisierung der neurophysiologischen Parameter ausschließlich in der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe beobachtet werden.

Im Gegensatz zur PCR konnte in der immunhistologischen Untersuchung keine NF-IL6 Expression im Cortex nachgewiesen werden. Dabei läuft die Expression von mRNA zeitlich schneller ab als die der Proteinexpression, sodass eventuell zu einem späteren Zeitpunkt auch eine vermehrte NF-IL6 Immunreaktivität im Cortex festgestellt werden könnte.

In mehreren Studien wurde bereits beschrieben, dass eine Vagusnervstimulation bzw. eine pharmakologische Imitation der VNS durch cholinerge Agonisten zu einer verminderten NF κ B Aktivität in der Peripherie führt [15, 426, 479, 526, 565]. NF κ B

ist ein Transkriptionsfaktor, welcher an der Regulation der Expression einer Vielzahl an proinflammatorischen Mediatoren beteiligt ist (siehe Kapitel I 2.2.1) und somit könnte seine Modulation dazu beitragen, die Inflammation zu kontrollieren. In der vorliegenden Arbeit konnten im Hypothalamus zwischen den septischen Gruppen jedoch keine Unterschiede in der I κ B α Expression festgestellt werden. I κ B α ist ein Inhibitor von NF κ B und wird unter anderem auch durch diesen induziert [287], sodass im Idealfall von der I κ B α Expression auf die NF κ B Expression geschlossen werden kann. Die Interpretation wird jedoch dadurch erschwert, dass die Expression von I κ B α außerdem durch inflammatorische Mediatoren induziert [278, 287] und durch NF-IL6 gehemmt werden kann [88]. Da die zusätzliche Vagusnervstimulation in der vorliegenden Arbeit eine verminderte NF-IL6 Expression bedingte, könnte dies wiederum zu einer Enthemmung der I κ B α Expression führen. Dies könnte bewirken, dass obwohl die VNS die NF κ B Expression hemmt und es deshalb eigentlich zu einer verringerten I κ B α Expression kommen sollte, dies durch den Wegfall der Hemmung durch NF-IL6 verschleiert wird. Das heißt, es ist nicht auszuschließen, dass die NF κ B Expression in der vorliegenden Studie durch die VNS gehemmt worden sein könnte, ohne dass dies durch die verwendeten Untersuchungen detektiert worden wäre. Aber auch wenn sich keine Effekte der Vagusnervstimulation auf die I κ B α mRNA Expression und/oder die NF κ B mRNA Expression ergeben, ist es dennoch nicht ausgeschlossen, dass die NF κ B Aktivität über diverse posttranskriptionale Mechanismen durch den *N. vagus* oder cholinerge Agonisten reguliert wird. So konnten Altavilla et al. (2006) zeigen, dass LPS zu einer Phosphorylierung von I κ B α in Monozyten führte, und dies durch eine Inkubation mit Nikotin vermindert wurde [15]. Zusätzlich wurde beschrieben, dass Nikotin oder eine Vagusnervstimulation eine Reduktion von I κ B α auf Proteinebene in mit TNF α stimulierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen, in der Kolonmucosa nach Colitis und in der Leber nach Ischämie und Reperfusion im Splanchnikusgebiet verhinderte [15, 426, 479, 552]. Dies weist darauf hin, dass eine Vagusnervstimulation oder Nikotin einen inflammatorisch bedingten Abbau von I κ B α vermindern und so zur Hemmung von NF κ B beitragen können.

Außerdem können sich verschiedene Transkriptionsfaktoren im Sinne eines „crosstalks“ gegenseitig beeinflussen. So ist bekannt, dass eine Vagusnervstimulation

oder cholinerge Agonisten die Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosinrest hemmen [95] und es dadurch zu einer Akkumulation von unphosphoryliertem STAT3 im Zytoplasma kommt. Dieses kann mit I κ B α um die Bindung an NF κ B konkurrieren. Durch die Komplexbildung von unphosphoryliertem STAT3 und NF κ B ist eine Hemmung der NF κ B Aktivität beschrieben [30, 372, 507], wobei sich jedoch auch die Aktivierung von alternativen Zielgenen ergeben könnte [547]. Um eine tatsächliche Regulation der NF κ B Aktivität im Gehirn nachweisen zu können, wären deshalb entsprechende Untersuchung der NF κ B Aktivität notwendig.

Wie bereits oben erwähnt ist auch STAT3 von Bedeutung für den cholinergen anti-inflammatorischen Weg. So konnten Pena et al. (2010) zeigen, dass in Abwesenheit des STAT3 Proteins eine Unterdrückung der TNF α Antwort in Makrophagen durch cholinerge Agonisten nicht möglich war [372]. STAT3 kann zelltypspezifisch sowohl pro-, als auch anti-inflammatorische Wirkungen induzieren. So vermittelt STAT3 beispielsweise sowohl die proinflammatorische Wirkung von IL-6, als auch die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 [223]. Die Effekte einer cholinergen Modulation von STAT3 werden in der Literatur kontrovers beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass cholinerge Agonisten in Makrophagen und Mikroglia über die Aktivierung von STAT3 anti-inflammatorische Effekte vermitteln konnten [30, 122, 143]. Dabei führt STAT3 unter anderem zu der Induktion anti-inflammatorischer Faktoren wie Tristetraprolin [30] und der vermehrten Bildung der Hämoxxygenase-1 [143], die sich wiederum positiv auf den Verlauf einer Sepsis auswirken [428, 501]. Andere Studien beschrieben jedoch eine Hemmung von STAT3 durch den *N. vagus* oder cholinerge Agonisten in Makrophagen und Endothelzellen, die ebenfalls anti-inflammatorisch wirkten [95, 481].

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA Expression des Inhibitors SOCS3 als indirekter Indikator der STAT3 Expression untersucht. STAT3 induziert die Expression von SOCS3 [273], sodass von der SOCS3 Expression auf die STAT3 Expression geschlossen werden kann. Doch auch in diesem Fall wird die Interpretation durch mehrere Faktoren erschwert. Es konnte gezeigt werden, dass eine VNS in der vorliegenden Studie im Hypothalamus zu einer signifikanten Reduktion der Induktion der SOCS3 Expression verglichen mit der LPS Gruppe und tendenziell auch mit der LPS+VGX Gruppe ($p = 0,11$) führte. Dies könnte bedeuten, dass die VNS eine

reduzierten STAT3 Expression verursacht. Eine Verminderung der STAT3 mRNA konnte jedoch in anderen Studien nicht nachgewiesen werden [481]. Des Weiteren könnte die VNS direkt auf SOCS3 wirken und dessen Bildung hemmen [95] oder die SOCS3 Expression könnte durch NF-IL6 beeinflusst werden. So ist bekannt, dass NF-IL6 die Expression von SOCS3 erhöht [551], und da NF-IL6 durch die VNS vermindert wurde, könnte es darüber auch zu einer Verminderung der SOCS3 Expression kommen. Dies würde dann bedeuten, dass SOCS3 durch die VNS gehemmt wird, während kein Einfluss auf die STAT3 Expression vorliegt. Dies könnte über die JAK2 zu einer erhöhten STAT3 Aktivität führen, welche wiederum die Expression anti-inflammatorischer Faktoren wie Tristetraprolin und Hämoxygenase-1 fördert [30, 143, 501]. Um diese verschiedenen Möglichkeiten zu klären, wäre es zum einen notwendig die Proteinexpression von SOCS3 zu untersuchen, aber auch die STAT3 Aktivität, sowie das Vorkommen von Tristetraprolin, Hämoxygenase-1 und phosphoryliertem sowie unphosphoryliertem STAT3 und Komplexen aus unphosphoryliertem STAT3 und NFκB. Hierbei müsste eine zelltypspezifische Reaktion berücksichtigt werden, da sich beispielsweise Endothelzellen und Makrophagen in ihrer Reaktion unterscheiden können. So konnte einerseits gezeigt werden, dass nikotinerge Agonisten zu einer Hemmung der STAT3 Phosphorylierung und dadurch zu einer verminderten inflammatorischen Aktivierung in Endothelzellen führte [95]. Andererseits wurde jedoch auch gezeigt, dass nikotinerge Agonisten in Makrophagen über die Aktivierung von STAT3 eine verminderte inflammatorische Aktivierung bewirkten [122]. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Vagusnervstimulation anti-inflammatorische Effekte über die Modulation von STAT3 ausübt, wobei die genauen Mechanismen im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht abschließend geklärt werden konnten.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Studie zum ersten Mal eine signifikante Verminderung der LPS bedingten Induktion von NF-IL6 festgestellt werden. Dies zeigte sich in der hypothalamischen mRNA Expression und bestätigte sich außerdem in der immunhistologischen Untersuchung, die eine verminderte nukleäre NF-IL6 Expression im SFO und benachbartem *Plexus choroideus* bestätigte. Dies deutet sowohl auf eine verminderte NF-IL6 Expression, als auch auf eine verminderte NF-IL6 Aktivität durch die zusätzliche Vagusnervstimulation hin.

NF-IL6 wird durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Zum einen liegt NF-IL6 in drei Isoformen vor: „liver-enriched activating protein“ (LAP1, LAP2) und „liver-enriched inhibitory protein“ (LIP). Die verschiedenen NF-IL6 Isoformen entstehen durch Unterschiede in der Translation aus einer einheitlichen mRNA [129]. Dabei dienen LAP1 und LAP2 als aktivierende Formen, während LIP in der Regel inhibitorisch wirkt. Die Aktivität von NF-IL6 hängt somit unter anderem vom Verhältnis von LAP zu LIP ab [554]. Des Weiteren tragen der Phosphorylierungsgrad von NF-IL6 [98, 499, 563] sowie die Serin/Threonin-Kinase Tribbles 1 (Trib1) [257] und die mikro RNA (miR)155 [198] zu seiner Regulierung bei. Auch eine Heterodimerbildung aus NF-IL6 und anderen Transkriptionsfaktoren kann unterschiedliche regulatorische Wirkungen entfalten [88, 216].

Welche Mechanismen in der vorliegenden Arbeit zu einer Hemmung von NF-IL6 beitragen, ist bislang nicht bekannt. NF-IL6 ist ein wichtiger proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, welcher zur Regulation zahlreicher inflammatorischer Zielgene wie verschiedene Zytokine [11, 376, 561], Enzyme (iNOS, COX2, mPGES) [136, 474], Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) [93] und Chemokine (CCL3, CCL4) beiträgt [562]. So könnte neben einer Regulation von STAT3 auch die Hemmung von NF-IL6 an der verminderten IL-6 Expression, die im Hypothalamus beobachtet wurde, beteiligt sein.

Insgesamt scheint die Regulation von Transkriptionsfaktoren ein wichtiger Ansatzpunkt für die anti-inflammatorischen Wirkungen des *N. vagus* zu sein.

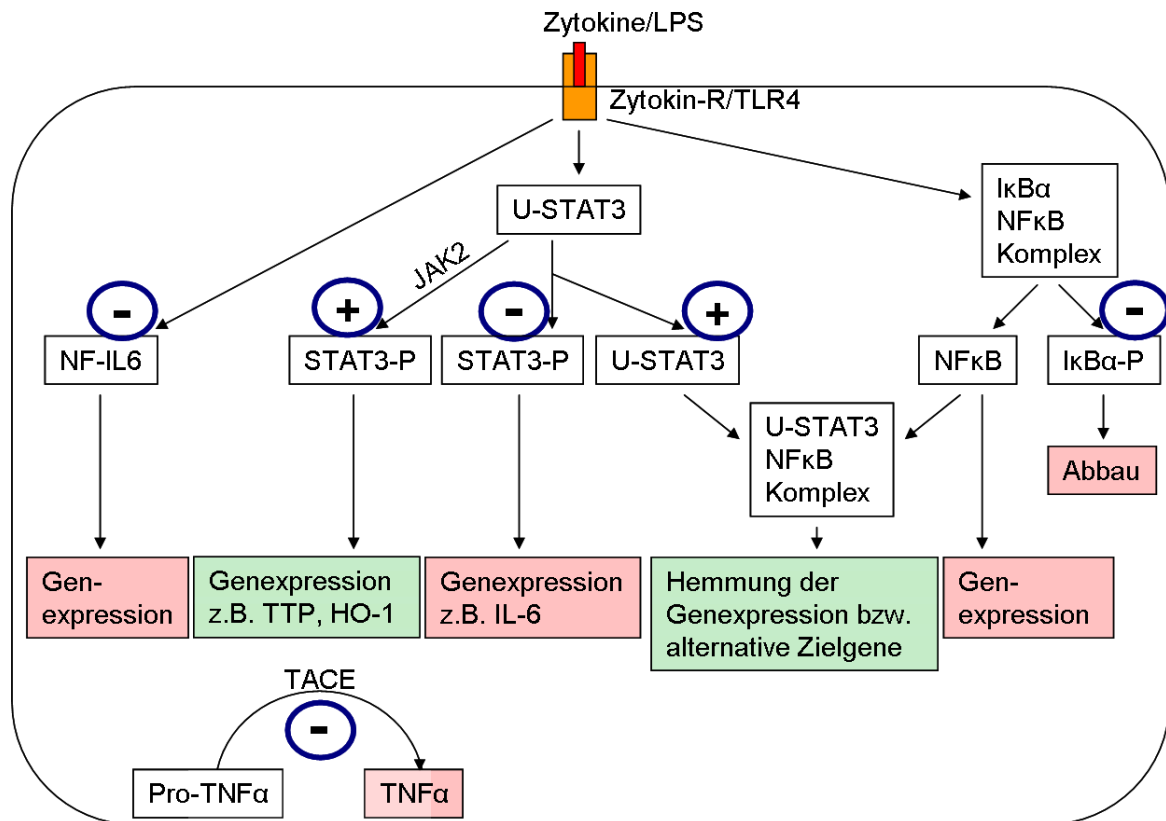


Abbildung 51: Mögliche Regulation von Transkriptionsfaktoren durch den cholinergen anti-inflammatorischen Weg.

LPS oder auch proinflammatorische Zytokine bewirken eine Induktion der mRNA Expression von Transkriptionsfaktoren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vagusnervstimulation zu einer signifikanten Verringerung der NF-IL6 mRNA und Proteinexpression führte. Ob und wie die STAT3 Expression und Aktivität im Gehirn durch cholinerge Mechanismen reguliert wird, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass eine VNS oder cholinerge Agonisten in der Peripherie je nach dem zu einer Hemmung oder auch Aktivierung der STAT3 Phosphorylierung führen. Dadurch kann die Expression proinflammatorischer Mediatoren gehemmt oder auch die Expression anti-inflammatorischer Mediatoren gefördert werden. Des Weiteren führt die Hemmung der STAT3 Phosphorylierung zu einer Akkumulation von unphosphoryliertem STAT3, welches mit IκBα um die Bindung an NFκB konkurriert. Die Komplexbildung von USTAT3 mit NFκB bewirkt eine Hemmung der NFκB Aktivität bzw. die Aktivierung alternativer Zielgene. Die Hemmung von NF-IL6 und STAT3 könnte zu der Vagusnerv bedingten Verminderung der IL-6 mRNA, die im Hypothalamus beobachtet wurde, beitragen. Obwohl für TNFα eine Regulation der Proteinexpression durch cholinerge Mechanismen beschrieben wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Änderung der mRNA Expression von TNFα im Gehirn gezeigt werden. Sun et al. (2013) beschrieben jedoch ebenfalls, dass eine Vagusnervstimulation nicht die mRNA Expression von TNFα, wohl aber seine Proteinexpression beeinflusst. Dies scheint über eine durch den α7nAChR vermittelte Hemmung des Enzyms TACE vermittelt zu werden [481]. TACE ist verantwortlich für die Konvertierung von Pro-TNFα zu TNFα. Hinweise auf eine Beeinflussung der NFκB mRNA Expression konnten in der vorliegenden Studie nicht gefunden werden, wobei ein solcher Effekt auch durch andere Einflüsse verschleiert worden sein könnte. In der Literatur wurde jedoch beschrieben, dass es unter anderem durch die Verminderung der Phosphorylierung und des Abbaus von IκBα zu einer Hemmung der NFκB Aktivität kommt [552]. Um jedoch eine Regulation der Aktivität von STAT3 und NFκB durch die Vagusnervstimulation im vorliegenden Modell nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

LPS = Lipopolysaccharid, Zytokin-R = Zytokinrezeptor, TLR = Toll like receptor, NF = Nuclear factor, STAT = Signal transducer and activator of transcription, P = Phosphoryliert, U = Unphosphoryliert, IκB = Inhibitor of κB, IL = Interleukin, AChR = Acetylcholinrezeptor, TACE = Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme

3.4 Zielgene

Zur Familie der Arachidonsäurederivate gehört eine Vielzahl bioaktiver Stoffe. Im Folgenden soll jedoch ausschließlich auf Prostaglandin (PG) E_2 eingegangen werden. Eine Vielzahl von Zellen ist in der Lage PGE_2 zu bilden. Im Gehirn erfolgt die Synthese von PGE_2 durch Neurone [37], Astrozyten [545], Mikroglia [474], Endothelzellen [149] und perivaskuläre Zellen [441]. Seine Bildung wird durch inflammatorische Mediatoren ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$) [328], LPS [506] aber auch durch neuronale Aktivität [27, 546] induziert und durch die Transkriptionsfaktoren NF-IL6 [474, 506] und $NF\kappa B$ [37] reguliert.

Die PGE_2 Synthese läuft in den folgenden 3 Schritten ab. Zunächst erfolgt die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Zellmembran. Klassischerweise wurde angenommen, dass dieser Schritt durch die Phospholipase A2 vermittelt wird. Jüngere Studien kommen jedoch zu dem Schluss, dass dabei im Gehirn vor allem auch die Monoacylglycerol Lipase von Bedeutung ist [259]. Daraufhin synthetisieren Cyclooxygenasen (COX) PGH_2 aus der Arachidonsäure und dieses wird schließlich durch Prostaglandin Synthasen zu PGE_2 umgewandelt [146].

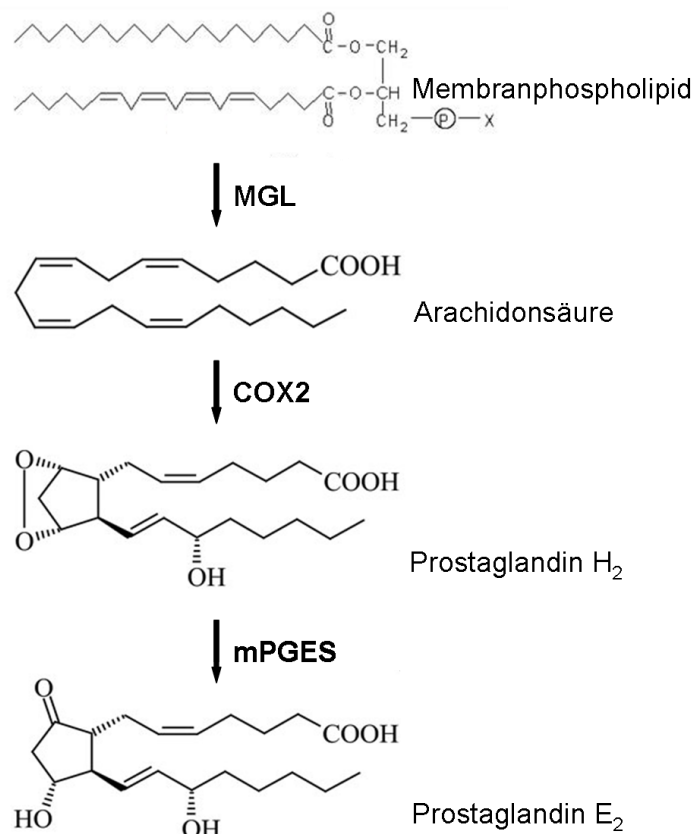


Abbildung 52: Synthese von PGE₂

MGL = Monoacylglycerol Lipase, COX = Cyclooxygenase, mPGES = mikrosomale Prostaglandin E Synthase. Modifiziert nach [266]

PGE₂ erfüllt eine Reihe von physiologischen Funktionen unter anderem für die gastrointestinale Sekretion [420], die Durchblutung der Niere [229], die Fortpflanzung [141], die Thrombozytenaggregation [518] und die Entzündung. Im Rahmen einer Entzündung ist es peripher für die Schmerzentstehung [248] und eine Vasodilatation im entzündeten Gebiet verantwortlich [538]. Zentral wirkt PGE₂ physiologischerweise als vasoaktiver Mediator und ist an der bedarfsadaptierten Durchblutung im Rahmen der neurovaskulären Kopplung beteiligt [574]. Auf diesen Mechanismus wurde in Kapitel I 6.2 näher eingegangen. Weitere zentrale Wirkungen von PGE₂ sind die Induktion von Fieber [360] und einer krankheitsbedingten Anorexie [265]. Außerdem kann PGE₂ abhängig von der Konzentration sowohl neuroprotektive [10, 253, 318, 494], als auch neurotoxische [52, 203, 487] Effekte vermitteln. So konnte einerseits gezeigt werden, dass PGE₂ zur Apoptose in corticalen Zellen führte [487], andererseits schützte PGE₂ jedoch auch vor einem LPS bedingten neuronalen Zelltod [253].

Bislang wurden zahlreiche Versuche unternommen den Sepsisverlauf durch die Inhibition von COX positiv zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von COX2 durch Rofecoxib in Ratten zu einer Verringerung der LPS bedingten Hypotonie, Tachykardie und Leberschädigung führte [206]. In klinischen Studien an Menschen konnte jedoch kein Vorteil von COX-Inhibitoren nachgewiesen werden [26, 47].

In der vorliegenden Studie wurde die mRNA Expression der zwei geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE₂ Synthese, die COX2 und die mikrosomale Prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) untersucht.

Le Maitre et al. (2015) konnten zeigen, dass PGE₂ für den Mechanismus des cholinergen anti-inflammatorischen Wegs essentiell ist. So bewirkte eine VNS in Wildtyp-Tieren einen Anstieg von ACh in der Milz und eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine. Dieser Effekt der VNS konnte in mPGES-1 Knockout Tieren nicht beobachtet werden. Allerdings konnten Le Maitre et al. (2015) weder in der Peripherie noch in verschiedenen Regionen des Gehirns Einflüsse einer VNS auf die LPS bedingte PGE₂ Synthese in Mäusen nachweisen [288]. Der Mechanismus,

über den PGE₂ am cholinergen anti-inflammatorischen Weg beteiligt ist, bleibt somit unklar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch auf eine Beeinflussung der COX2 durch die efferente Vagusnervstimulation hin.

Insgesamt sind in der Literatur zahlreiche Studien beschrieben, welche die Wirkung von Nikotin auf die PGE₂ Synthese überwiegend in Monozyten, aber auch in Mikroglia untersuchten. Die Ergebnisse sind dabei jedoch sehr widersprüchlich und reichen von einer Induktion [49, 123, 370] über keine Beeinflussung [288, 552] bis hin zu einer Inhibition [478, 552] von PGE₂ und COX2. Wodurch sich diese Unterschiede ergeben ist nicht ganz klar, die verwendeten Zellen und die Nikotindosis könnten jedoch einen Einfluss darauf haben.

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Verminderung der LPS bedingten Induktion der COX2 Expression verglichen mit der zusätzlichen Vagotomie im Hypothalamus festgestellt werden. Außerdem bewirkte eine zusätzliche Vagotomie, unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation im Cortex eine Verminderung der COX2 Expression verglichen mit der LPS Gruppe. Es konnte jedoch kein Einfluss auf die der COX2 nachgeschaltete mPGES-1 Expression beobachtet werden.

Im Cortex entspricht die Reduktion der COX2 Expression der der Transkriptionsfaktoren und Zytokine und könnte auf die gleichen Mechanismen zurückzuführen sein. Im Hypothalamus zeigte sich jedoch ein eindeutiger Einfluss der Vagusnervstimulation im Vergleich zur Vagotomie. Ob die alleinige Hemmung der COX2 mRNA Expression ausreicht, die PGE₂ Synthese im Gehirn zu vermindern ist aufgrund früherer Studien wahrscheinlich [210, 293], müsste jedoch auf Proteinebene weiter untersucht werden.

Die Hemmung der COX2 weist also auf Einflüsse der Vagusnervstimulation auf den zerebralen Arachidonsäuremetabolismus hin. Interessant wäre nun auch eine Untersuchung der Expression der Monoacylglycerol Lipase und Phospholipase A₂, welche Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellmembran freisetzen [259]. Auch die Hemmung der Monoacylglycerol Lipase oder Phospholipase A₂ könnte zu einer verminderten Freisetzung vasoaktiver Mediatoren im Gehirn führen. Wäre diese jedoch durch die Vagusnervstimulation unbeeinflusst, könnte es zu einer Akkumulation von Arachidonsäure kommen, die im folgenden über andere Wege des

Arachidonsäuremetabolismus beispielsweise durch Lipoxygenasen, Epoxygenasen oder Hydroxylasen zu Leukotrienen, EETs und 20-HETE umgewandelt werden könnten. EETs besitzen vasodilatatorische Eigenschaften und werden unter anderem auch in Astrozyten synthetisiert, während HETE in der glatten Muskulatur der Hirngefäße gebildet wird und vasokonstriktorisch wirkt [18, 282, 335, 574]. Beiden wird eine Bedeutung für die Regulation der funktionellen zerebralen Durchblutung zugesprochen. Auch für Leukotriene wurde eine Synthese im Gehirn nachgewiesen [280, 298]. Sie vermitteln dabei unter anderem eine Vasokonstriktion [403] und eine vermehrte Permeabilität der BBB [54].

Insgesamt wäre es deshalb sinnvoll, die tatsächliche PGE_2 Konzentration, sowie die Aktivität der Phospholipase A2 und der Monoacylglycerol Lipase zu messen. Bis dato wurden mögliche Effekte einer Vagusnervstimulation auf EETs oder HETE noch nicht untersucht. Die Untersuchung alternativer Arachidonsäuremetabolite wie EET oder HETE könnte somit vielleicht Hinweise auf eine mögliche Modulation der zerebralen Mikrozirkulation durch die Vagusnervstimulation liefern. Bezüglich der neurovaskulären Kopplung wäre außerdem die Untersuchung von Astrozyten interessant, da diese an der Regulation des zerebralen Blutflusses beteiligt sind. Eine mögliche zelltypspezifische Änderung der PGE_2 Synthese in Astrozyten könnte bei Untersuchungen des gesamten Hirngewebes durch die PGE_2 Synthese in perivaskulären Makrophagen, Mikroglia und Endothelzellen unter Umständen verschleiert werden.

4 Auswirkungen einer VGX und VGX+VNS auf Faktoren des zellulären Wegs während einer LPS bedingten systemischen Inflammation

4.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten werden als wichtige Komponente des cholinergen anti-inflammatorischen Wegs angesehen. Dabei sind ACh produzierende T-Lymphozyten an der Umschaltung des anti-inflammatorischen Signals vom Nervensystem auf das Immunsystem in der Milz beteiligt [310, 402] (siehe Kapitel I 4.2). Deshalb könnte vermutet werden, dass sie möglicherweise durch Migration das anti-inflammatorische Signal auch in andere Körperregionen tragen könnten. Andererseits besitzen T-Lymphozyten als inflammatorische Zellen jedoch auch schädigendes Potenzial. So sind sie im Gehirn unter anderem an der Entstehung von MS und anderen Erkrankungen beteiligt (siehe Kapitel I 3.2.3). Dabei hängt die Wirkung der Lymphozyten unter anderem von ihrer Differenzierung in Th1, Th2, Th17 oder Tregs ab [543]. So können Th17-Zellen beispielsweise IL-17 sezernieren, welches in der vorliegenden Arbeit unter anderem auch nach LPS Applikation im Cortex und Hypothalamus nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel III 2.2.1, 2.3.1 und Kapitel IV 3.2). Deshalb ist zum einen die Anzahl von T-Lymphozyten im Gehirn von Interesse aber besonders auch ihr dortiger Funktionsstatus.

Eine Modulation der T-Zell abhängigen Inflammation durch cholinerge Mechanismen wurde in mehreren Studien gezeigt. So bewirkte eine Depletion des $\alpha 7$ nAChR in Mäusen eine verstärkte Transplantationsabstoßung und eine erhöhte Bildung von IL-2 und IL-17 [424]. Nicolussi et al. (2009) konnten außerdem zeigen, dass die Depletion des $\alpha 7$ nAChR zu einer erhöhten Einwanderung von T-Lymphozyten nach einer facialis Axotomie führte [350]. Zusätzlich beschrieben Nizri et al. (2009) eine verminderte Proliferation von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Nikotin, sowie einen Switch von einer Th1 und Th17 dominierten Reaktion hin zu einer Th2 dominierten Reaktion. In diesem Modell bewirkte Nikotin außerdem eine Verminderung der klinischen und histologischen Anzeichen einer EAE, verbunden mit einer Verminderung der CD4+ T-Zellinfiltrate [353].

In der vorliegenden Arbeit führte LPS zu einer leichten Zunahme der T-Lymphozyten Anzahl im Gehirn. Insgesamt war die Anzahl an T-Lymphozyten im Gehirn jedoch gering und eine signifikante Auswirkung der Vagusnervstimulation auf die T-Lymphozytenanzahl konnte weder im Cortex noch im Hypothalamus festgestellt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Untersuchungen 4,5 Stunden nach LPS Applikation durchgeführt wurden. Dieser Zeitpunkt ist vermutlich zu früh, um eine ausgeprägte lymphozytäre Antwort im Gehirn beobachten zu können. Um mögliche Effekte der VNS im Gehirn unter septischen Bedingungen zu untersuchen, müssten deshalb zusätzliche Untersuchungen zu späteren Zeitpunkt durchgeführt werden. Des Weiteren ist wie oben bereits erwähnt die Differenzierung der T-Lymphozyten von Bedeutung. Die Messung der IL-17 mRNA erwies sich dabei jedoch als wenig aussagekräftig (siehe Kapitel III 2.2.1 und 2.3.1), könnte jedoch Hinweise auf eine Einwanderung von Th17 Zellen liefern. Deshalb sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Differenzierung und Funktion der einwandernden Lymphozyten zu klären. Die bisherigen Ergebnisse sprechen jedoch nicht dafür, dass die beobachteten neuroprotektiven Effekte der Vagusnervstimulation durch den Einfluss zentraler T-Lymphozyten vermittelt werden.

4.2 Mikroglia

Mikroglia sind die wichtigste residente Immunzellpopulation des Gehirns und können sowohl neuroprotektive als auch schädliche Effekte vermitteln (siehe Kapitel I 3.2.1). In der Literatur wurde beschrieben, dass Acetylcholinagonisten zum einen die Proliferation, aber auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α in Mikroglia hemmen können [123, 179, 190, 367-368, 451]. Berichte über Auswirkungen einer Vagotomie und Vagusnervstimulation auf die mikrogliale Aktivierung während einer LPS bedingten Inflammation liegen jedoch bislang noch nicht vor. Jiang et al. (2014) beschrieben bei Stimulation des intakten *N. vagus* in einem Ischämie/Reperfusion (I/R) Modell, dass sowohl die I/R Gruppe als auch die I/R+VNS Gruppe morphologisch eine Mikrogliaaktivierung zeigte, die sich zwischen den Gruppen nicht unterschied. Nach VNS zeigte sich jedoch eine deutliche Induktion des $\alpha 7$ nAChR, eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine und eine Verbesserung der klinischen Symptome [238]. In der vorliegenden Arbeit wurde CD68 als Marker

der mikroglialen Aktivität gemessen. Dabei ließen sich jedoch keine signifikanten Effekte der Vagusnervstimulation auf die CD68 mRNA Expression nachweisen. Lediglich im Cortex führte eine zusätzliche Vagotomie zu einer reduzierten CD68 Expression, ähnlich wie es im Cortex auch teilweise für die Zytokine und Transkriptionsfaktoren beobachtet werden konnte.

Demnach konnte in dem hier verwendeten Modell kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die Modulation der mikroglialen Aktivierung einen wesentlichen Mechanismus der beobachteten Vagusnerv bedingten Neuroprotektion darstellt. Dies sollte jedoch durch weitere Untersuchungen abgesichert werden. So wird der untersuchte Marker CD68 typischerweise für aktivierte Mikroglia vom Typ M1 verwendet, welchen überwiegend proinflammatorische Wirkungen zugesprochen wird. Durch eine Untersuchung von Zellmarkern für aktivierte Mikroglia vom Typ M2, denen eher anti-inflammatorisches Potenzial zugesprochen wird [252], könnte beispielsweise untersucht werden, ob die VNS die Differenzierung von Mikroglia moduliert.

4.3 ICAM-1 und CXCL1

Um Hinweise auf die Modulation der Immunzellmigration durch die Vagusnervstimulation zu erhalten, wurden das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das Chemokin CXCL1 untersucht.

ICAM-1 wird häufig eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen zugeschrieben [183, 392, 456, 466, 548]. Es scheint dabei auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis zu spielen. So konnte in einem polymikrobiellen Sepsismodell gezeigt werden, dass Antikörper gegen ICAM-1 zu einer Verminderung von Lungenschäden, einer erhöhten Bakterienclearance und einer geringeren Sterblichkeit in Mäusen führte [564]. Außerdem wird ICAM-1 nach inflammatorischen Stimuli auch auf Endothelzellen des Gehirns exprimiert [148, 152, 469] und es konnte in Mäusen gezeigt werden, dass die Hemmung oder Depletion von ICAM-1 bei einer zerebralen Ischämie [103, 464], einer EAE [80] oder systemischen LPS Applikation [63] zu einem verminderten Influx von Leukozyten ins Gehirn, verbunden mit einer Reduktion inflammatorischer Läsionen führte [80, 103, 464].

Chemokine sind Signalmoleküle, die neben anderen Funktionen unter anderem wichtig für die Chemotaxis, Diapedese, Aktivierung, Degranulation und Reifung von Immunzellen sind. Sie werden nach der Stellung ihrer Cysteinreste und dazwischen liegenden Aminosäuren in vier Gruppen eingeteilt: CXC Chemokine, CC Chemokine, C Chemokine und CX₃C Chemokine. Chemokine können von einer Vielzahl von Zellen einschließlich Leukozyten, Endothelzellen, Mikroglia und Astrozyten als Reaktion auf inflammatorische Stimuli gebildet werden [217, 431, 450, 573]. Sie dirigieren die zelluläre Immunantwort, indem sie Leukozyten durch einen chemotaktischen Gradienten anlocken und aktivieren. Des Weiteren vermitteln sie die feste Bindung der Immunzellen an das Endothel im Rahmen der Diapedese. Dabei werden Chemokine auf der luminalen Seite der Endothelzellen exprimiert und können so G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren auf Leukozyten aktivieren. Dies führt zu einer morphologischen Veränderung von Integrinen, welche nun eine feste Bindung mit Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen eingehen können [466]. Im Anschluss an die Diapedese vermitteln sie die gerichtete Migration der Immunzellen im Gewebe. Das in der vorliegenden Studie untersuchte CXCL1, welches an den Chemokinrezeptor CXCR2 bindet, wurde als ein wichtiges Chemokin für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins Gehirn identifiziert [415]. Ähnlich wie für ICAM-1 konnte auch für CXCL1 gezeigt werden, dass Antikörper gegen CXCL1 zu einer reduzierten Adhäsion NG an Endothelzellen im Gehirn nach systemischer LPS Applikation oder Induktion einer EAE führte. Dies war außerdem mit einer verminderten Krankheitsausprägung in Mäusen mit EAE verbunden [415] und ähnliche Resultate konnten auch nach Hemmung des Chemokinrezeptors CXCR2 durch ein Antiserum beobachtet werden [416]. Neben Adhäsionsmolekülen sind also auch Chemokine von großer Bedeutung für die Immunzellrekrutierung und der damit verbundenen Neuroinflammation. Auch für die Sterblichkeit während einer Sepsis konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung von CXCR1 und CXCR2 einen protektiven Effekt in Mäusen nach CLP oder Thioglycolat induzierter Peritonitis zeigte [242, 345].

Sowohl eine Reduktion von CXCL1 [173, 425, 524] als auch von ICAM-1 [95, 276, 426, 529] durch eine Vagusnervstimulation oder cholinerge Agonisten wurde bereits in der Literatur beschrieben. So konnten Krzyzaniak et al. (2011) zeigen, dass die

Stimulation des intakten rechten *N. vagus* zu einer signifikanten Verringerung der ICAM-1 Immunreaktivität und CXCL1 Proteinexpression in der Lunge 6 Stunden nach einer partiellen Verbrennung in Mäusen führte. Dies ging außerdem mit einer reduzierten Einwanderung NG in die Lunge einher [276]. Auch Wang et al. fanden (2012) eine reduzierte ICAM-1 Proteinexpression im Plasma und Herz 2 Stunden nach einer Ischämie und Reperfusion durch eine Stimulation des intakten rechten *N. vagus* in Ratten. [529]. Eine Reduktion der ICAM-1 Expression durch cholinerge Agonisten konnte ebenfalls in humanen Endothelzellen nach TNF α Stimulation [426] und nach Stimulation mit IL-6 in Kombination mit dem sIL-6R gezeigt werden [95]. In einigen Studien führte dies außerdem zu einer reduzierten Einwanderung von Immunzellen in das betroffene Gewebe [425-426]. Des Weiteren führten cholinerge Agonisten zu einer Reduktion der CXCL1 Expression in Mäusen nach renaler Ischämie und Reperfusion [425], sowie in einem Modell für rheumatoide Arthritis in humanen Synoviozyten nach Stimulation mit IL-1 [524] und in humanen Endothelzellen nach der Stimulation mit TNF α [426]. Über eine Regulation von ICAM-1 und CXCL1 im Gehirn durch eine efferente Vagusnervstimulation ist jedoch noch wenig bekannt.

In der vorliegenden Studie konnte im Cortex eine signifikante Reduktion der CXCL1 und ICAM-1 mRNA Expression sowohl in der LPS+VGX als auch in der LPS+VGX+VNS Gruppe verglichen mit der reinen LPS Gruppe festgestellt werden. Somit scheint die CXCL-1 und ICAM-1 Expression ähnlich wie die Expression von IL-1 β , I κ B α , SOCS3 und COX2 im Cortex anders reguliert zu sein als im Hypothalamus, wobei wie bereits bei den Zytokinen näher erläutert eine Unterbrechung der afferenten Fasern des *N. vagus* durch die Vagotomie die Signaltransduktion inflammatorischer Signale in das Gehirn unter bestimmten Bedingungen verhindern bzw. abschwächen kann.

Im Hypothalamus hingegen bewirkte eine zusätzliche Vagusnervstimulation eine Reduktion der LPS bedingten Induktion der CXCL1 Expression verglichen mit der LPS und tendenziell auch der LPS+VGX ($p = 0,08$) Gruppe. Dies weist drauf hin, dass die Vagusnervstimulation durch die Modulation von Chemokinen die Immunzellmigration ins Gehirn während einer Sepsis regulieren könnte.

ICAM-1 zeigte ebenfalls eine Verringerung der LPS bedingten ICAM-1 mRNA Expression durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation im Hypothalamus. Dies

könnte auf eine verminderte endotheliale Aktivierung und eine verminderte Rekrutierung von Immunzellen hinweisen. Allerdings konnten diese Ergebnisse in der immunhistologischen Untersuchung nicht nachvollzogen werden. So zeigten sich weder im Cortex noch im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* signifikante Unterschiede zwischen den septischen Gruppen. Die Differenz zwischen der mRNA und Protein Expression könnte sich durch eine zeitliche Abfolge erklären, wobei die Veränderungen der mRNA Expression noch nicht auf die Proteinebene übersetzt worden sind. Eine Modulation der ICAM-1 Expression könnte demnach zu einem späteren Zeitpunkt von Bedeutung sein. Allerdings war die Verbesserung der neurophysiologischen Parameter bereits zu diesem frühen Zeitpunkt sichtbar, eine spätere Veränderung von ICAM-1 würde deshalb die beobachteten Effekte nicht erklären können. Außerdem konnten im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus* mögliche feine Unterschiede bei der verwendeten Antikörperkonzentration nicht nachgewiesen werden. Um eine deutliche Färbung der ICAM-1 positiven Zellen im Cortex zu erreichen, wurde eine relativ hohe Antikörper Konzentration verwendet, die vor allem im *Plexus choroideus* zu einer sehr starken ICAM-1 Immunreaktivität führte. So konnte hier beispielsweise auch keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den septischen Gruppen beobachtet werden. Obwohl ICAM-1 im *Plexus choroideus* konstitutiv exprimiert wird, wäre jedoch dennoch eine Induktion durch LPS zu erwarten gewesen.

Durch welche Mechanismen die Vagusnervstimulation die ICAM-1 und CXCL1 Expression im Hypothalamus reguliert, ist noch nicht vollständig geklärt. So könnte beispielsweise die Vagusnervstimulation die ICAM-1 und CXCL1 Expression einerseits über die Regulation von Transkriptionsfaktoren steuern (siehe Kapitel 3.3), oder aber auch durch eine Modulation der Leptinkonzentration. Leptin ist als appetitregulierendes Hormon bekannt, trägt aber als Neuroimmunmediator auch zur Entstehung von „sickness behaviour“ und der Migration von Immunzellen bei (siehe Kapitel I 3.1.2). So konnte bereits gezeigt werden, dass Leptin eine wichtige Rolle bei der Induktion der ICAM-1 und CXCL1 Expression im Gehirn spielt [417]. Auf die Rolle von Leptin soll in Kapitel 4.5 näher eingegangen werden.

4.4 NG und Kolokalisation

Wie bereits in der Einleitung näher erläutert (siehe Kapitel I 3.2.4), tragen NG zu sepsisbedingten Organschäden in Lunge [2, 243, 530], Niere [201], Leber [205] und Darm [277] bei. NG können dabei zum einen über die Bildung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine [431] die Inflammation verstärken. So konnten Aguilar-Valles et al. (2014) zeigen, dass eine Neutropenie die LPS bedingte Induktion der IL-1 β mRNA Expression im Hypothalamus in Mäusen nahezu vollständig verhinderte [8]. Zum anderen können NG durch die Freisetzung von Proteasen (MPO, Matrixmetalloproteinasen) [132], reaktiven Sauerstoffspezies [348] und extrazellulärer dekontaminierter DNA [14] zu einer Gewebeschädigung führen [458]. Eine vermehrte Adhäsion und Aggregation NG an Endothelzellen und eine verminderte Verformbarkeit können zusätzlich auch rheologischen Veränderungen, wie die Verlegung kleinerer Gefäße und dadurch eine Störung der Mikrozirkulation bewirken [76, 268, 455, 461]. NG besitzen ein hohes neurotoxisches Potenzial, wie in mehreren Zellkulturmodellen [14, 132, 235, 348, 422] und in *in vivo* Versuchen [235, 422] gezeigt werden konnte. Dennoch wird ihre Bedeutung für unterschiedliche ZNS Pathologien kontrovers diskutiert. So zeigte eine Depletion von Leukozyten teilweise keine neuroprotektive Wirkung in I/R Modellen [432, 434, 489] oder eine vermehrte Einwanderung NG zeigte sogar neuroprotektive Effekte in Form einer verkleinerten Infarktgröße [9]. Andere Arbeiten legen jedoch eine negative Rolle NG in ZNS Pathologien wie MS/EAE [317, 541] und einem Schlaganfall [316, 449] nahe. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NG nach peripherer LPS Applikation an der Entstehung von depressionsartigen Verhalten und einem gestörten Sozialverhalten bei Mäusen beteiligt sind und somit eine Rolle für die Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn spielen [8].

In der vorliegenden Arbeit führte LPS zu einem signifikanten Anstieg NG im Cortex sowie im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus*. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl NG zwischen den drei LPS Gruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden, auch wenn in der Literatur beschrieben wurde, dass eine Vagusnervstimulation die Einwanderung NG in zahlreiche periphere Organe vermindert. So führte eine Vagusnervstimulation [15, 86, 560] oder Nikotin [425] zu einer verminderten Einwanderung NG in mehreren I/R Modellen in Lunge und Darm

[15], dem Herzen [86, 560] und der Niere [425]. Auch nach CLP [66] oder LPS Applikation [97, 175], einer Verbrennung [276], einem traumatisch hämorrhagischen Schock [292], einer Trinitrobenzolsulfonsäure induzierten Colitis [479] und bei einer durch Carrageenan induzierten lokalen Entzündung [222, 426] konnte durch eine Vagusnervstimulation [66, 97, 222, 276, 292, 479] oder cholinergen Agonisten [175, 222, 426] eine verminderte Einwanderung NG in die Lunge [66, 97, 276, 292], den Darm [479], den Bauchraum [175] und subkutanes, entzündetes Gewebe [222, 426] beobachtet werden.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit weder die Anzahl NG noch die Proteinexpression von ICAM-1 durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation signifikant verändert wurde, konnte dennoch ein modulatorischer Effekt auf die zelluläre Immunantwort im Gehirn beobachtet werden. So zeigte sich bei Betrachtung der Kolo-kalisation von NG mit ICAM-1 im Cortex, dass LPS eine signifikante Erhöhung dieser Kolo-kalisation in der LPS und LPS+VGX Gruppe verglichen mit den Kontrollen bewirkte, während eine zusätzliche Vagusnervstimulation diesen Effekt verhinderte. Ein vermehrtes Rollen und eine Adhäsion NG an zerebralen Gefäßen konnte durch intravitale Mikroskopie bereits vier Stunden nach LPS Applikation in Mäusen beobachtet werden [567]. Die Migration ins Gehirnparenchym erfolgte jedoch in den meisten Studien erst nach zwölf bis vierundzwanzig Stunden [8, 63, 235-236, 417, 567]. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die NG in der vorliegenden Studie noch nicht ins Gehirnparenchym ausgewandert waren, sondern sich im Stadium der Endothelinteraktion befanden. Dies könnte bedeuten, dass eine Vagusnervstimulation die Interaktion zwischen NG und dem Endothel bzw. ihr Rollen und ihre Adhäsion an Endothelzellen vermindert, was zu einer verringerten Neurotoxizität und zerebralen Inflammation, sowie zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation beitragen könnte. So ist bekannt, dass eine transendotheliale Migration den Phänotyp und die Funktion NG verändern kann. Allen et al. (2002) konnten zeigen, dass transmigrierte NG zum Zelltod von Neuronen in Zellkultur führten, während nicht transmigrierte NG die Vitalität der Neuronen nicht beeinflussten [14]. Eine transendotheliale Migration bewirkt bei NG beispielsweise eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinrezeptoren und Proteasen, sowie eine Hemmung der Apoptose, eine erhöhte Fähigkeit zur Migration und eine verstärkte Zytotoxizität [14, 51, 197, 319, 356].

Interessant ist außerdem, dass eine Vagusnervstimulation die Interaktion zwischen NG und Endothelzellen verminderte, ohne aber die Proteinexpression von ICAM-1 oder die Anzahl der NG zu beeinflussen. Dies weist darauf hin, dass die Modulation der Rekrutierung NG durch die Vagusnervstimulation weder von der Expression von ICAM-1 noch von der Anzahl NG abhängt. Dadurch ergibt sich die Frage, durch welche Mechanismen dieser Effekt vermittelt werden könnte. Ein möglicher Mechanismus ist die Modulation der endogenen Freisetzung von Leptin durch die zusätzliche Vagusnervstimulation, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll. Des Weiteren könnte die Vagusnervstimulation direkte Auswirkungen auf den Phänotyp oder Aktivierungsstatus NG vermitteln. So konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl eine Vagusnervstimulation, als auch der cholinerge Agonist Nikotin bei Mäusen mit intakter Milz zu einer reduzierten LPS induzierten Expression des β_2 Integrins CD11b auf NG aus dem Blut führte [222]. Wie andere Immunzellen auch, stellen NG keine homogene Zellpopulation dar. Friedlender et al. (2009) konnten beispielsweise zeigen, dass NG in Tumoren, reguliert durch TGF- β , entweder einen eher proinflammatorischen anti-Tumor Phänotyp oder einen eher anti-inflammatorischen pro-Tumor Phänotyp ausprägen können [167]. Eine ähnliche Modulation NG durch den *N. vagus* ist noch nicht bekannt, wäre aber vorstellbar.

Welche Rolle unterschiedliche Funktionsstadien NG bei der Entstehung eines SAD spielen und ob die Vagusnervstimulation einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus der NG hat müsste jedoch noch näher untersucht werden.

4.5 Leptin

Wie in der Einleitung bereits erläutert (siehe Kapitel I 3.1.2) wurde Leptin ursprünglich als wichtiger Faktor für den Energiehaushalt beschrieben. Dabei spielen vagale Afferenzen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Futternaufnahme und Verdauung.[137]. Über eine Beeinflussung von Leptin durch den efferenten Anteil des *N. vagus* hingegen, ist bislang wenig bekannt. Ziombre et al. (2009) und Gil et al. (2011), (2012) fanden, dass eine chronische Vagusnervstimulation bei Ratten, welche mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, zu einer Reihe von Veränderungen führte, die mit der Futternaufnahme und dem Metabolismus in Verbindung stehen. Unter anderem bewirkte die chronische VNS auch eine Reduktion der Leptinkonzentration

im Serum [176-177, 572]. Eine Modulation von Leptin durch den *N. vagus* scheint somit prinzipiell möglich, auch wenn Sobocki et al. (2006) keine Veränderung der Leptinlevel in Schweinen mit chronischer VNS feststellen konnte [459].

Heute ist neben der Rolle von Leptin im Energiehaushalt auch seine Bedeutung für das Immunsystem und seine Funktion als Neuroimmunmodulator bekannt. Leptin kann durch LPS und inflammatorische Zytokine induziert werden [153, 189, 312, 503], auch wenn dies nicht in allen Studien der Fall war [170, 262, 465]. In der vorliegenden Arbeit jedoch führte LPS zu einem signifikanten Anstieg der Leptin Plasmakonzentration. Mögliche Auswirkungen einer VNS auf Leptin während einer akuten Inflammation wurden bislang noch nicht untersucht. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einem signifikant verringerten LPS bedingten Anstieg der Leptin Plasmakonzentration verglichen mit der zusätzlich vagotomierten Gruppe, nicht jedoch mit der reinen LPS Gruppe führte. Da Leptin auf unterschiedlichste Weise mit dem Immunsystem interagiert, könnte eine Modulation der Leptinkonzentration durch eine Vagusnervstimulation vielfältige Auswirkungen auf die Immunantwort vermitteln. Im Folgenden soll auf einige Aspekte wie Zytokine, Transkriptionsfaktoren und NG eingegangen werden, die in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung waren.

So zeigten Leptin-defiziente Mäuse und Mäuse mit defektem Leptinrezeptor eine erhöhte IL-6 und TNF α Plasmakonzentration und eine erniedrigte IL-1 β und TNF α Expression im Gehirn nach LPS Applikation. Eine Antagonisierung von Leptin durch ein Leptinantiserum hatte jedoch keine Auswirkungen auf peripheres oder zentrales IL-1 β und TNF α [417]. Im Gegensatz dazu konnten Sachot et al. (2004) zeigen, dass ein Leptinantiserum einen LPS bedingten Anstieg der IL-1 β und IL-1 α mRNA Expression im Hypothalamus in Ratten verringerte [423]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch lediglich eine Verminderung des LPS bedingten Anstiegs der IL-1 β mRNA Expression im Cortex durch eine zusätzliche Vagotomie verglichen mit der LPS Gruppe beobachtet werden. Allerdings können eine Vagotomie und eine Vagusnervstimulation selbst bereits Effekte auf die Zytokinexpression im Gehirn vermitteln (siehe Kapitel III 3.2) [195, 238, 285, 569], sodass mögliche kleine Effekte einer Modulation durch Leptin hier überlagert worden sein könnten. Auch im Plasma konnte kein Anstieg, sondern sogar eine Reduktion der TNF α oder IL-6 Konzentration

in der vagusnervstimulierten Gruppe beobachtet werden. Hier ist bekannt, dass eine Vagusnervstimulation vermutlich über eine Hemmung von NF κ B in Makrophagen zu einer verminderten TNF α und IL-6 Plasmakonzentration führt (siehe Kapitel III 3.1) [71, 310]. Deshalb ist davon auszugehen, dass eine Modulation der Leptinkonzentration durch eine Vagusnervstimulation im vorliegenden Versuchsaufbau wenn überhaupt, dann nur geringe Auswirkungen auf die Zytokinexpression im Plasma und Gehirn bewirkte.

Des Weiteren kann Leptin über Transporter die BBB überqueren [279] und im Gehirn ähnlich wie IL-6 zu einer Aktivierung von STAT3 in unterschiedlichen Gehirnarealen, vor allem in den CVOs, den Meningen und dem Ependym, sowie in Gefäßen führen [339, 418]. In der vorliegenden Arbeit konnten zwar Veränderungen der SOCS3 mRNA Expression im Gehirn beobachtet werden, aber auch hier scheinen andere Faktoren, wie afferente oder efferente Wirkungen des *N. vagus*, ein Crosstalk mit anderen Transkriptionsfaktoren oder postranskriptionelle Veränderungen zu überwiegen (siehe Kapitel III 3.3) [15, 88, 95, 372, 426]. Ähnlich wie bei der Leptinplasmakonzentration bewirkte eine zusätzliche Vagusnervstimulation einen signifikant verminderten LPS bedingten Anstieg der COX2 mRNA Expression im Hypothalamus verglichen mit der LPS+VGX Gruppe. Inoue et al. (2006) konnten zeigen, dass Leptin über IL-1 β zu einer Induktion von COX2 im Hypothalamus führte [226]. Im Gegensatz dazu zeigten Rummel et al. (2008) jedoch, dass IL-6 und nicht Leptin maßgeblich an der COX Expression im Gehirn beteiligt ist [418]. In der vorliegenden Arbeit sind sowohl IL-6 als auch Leptin, nicht aber IL-1 β , durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation reduziert, sodass nicht eindeutig ist, in welchem Maße IL-6, Leptin oder auch andere Faktoren zu einer Vagusnerv bedingten Verminderung der COX2 Expression im Hypothalamus beitragen.

Eine kurze Form des Leptinrezeptors (ObRa) ist auch auf NG exprimiert [555]. Eine Aktivierung NG durch Leptin erhöht ihre Phagozytoseaktivität [331], die ROS Produktion [85, 279] und die Expression von CD11b [331, 555] und hemmt ihre Apoptose [371, 504]. Des Weiteren wirkt Leptin chemotaktisch auf NG [330, 504]. Rummel et al. (2010) konnten jedoch zeigen, dass eine Migration NG ins intakte Gehirn nach LPS Applikation vermutlich nicht von einer direkten Modulation NG abhängt, sondern durch die Aktion von Leptin an der langen Form des Leptinrezeptors

(ObRb) im Gehirn zustande kommt. Dabei konnte gezeigt werden, dass genetisch leptindefiziente Mäuse und Mäuse mit einem Defekt in der langen Form des Leptinrezeptors nach LPS Stimulation eine signifikant verminderte Einwanderung NG ins intakte Gehirn verglichen mit Wildtyp Mäusen aufwiesen. Dies ging mit einer geringeren IL-1 β , CXCL1, CXCL2 und ICAM-1 Expression im Gehirn einher. Eine Hemmung der IL-1 β und ICAM-1 Expression scheint dabei wichtig aber nicht notwendig zu sein. So führte die Antagonisierung von Leptin durch Leptinantiserum in Wildtypmäusen zu einer verringerten CXCL1 und CXCL2 Expression, sowie einer verminderten Einwanderung NG ins Gehirn, nicht aber zu einer Reduktion der ICAM-1 und IL-1 β Expression [417].

In der vorliegenden Arbeit führte eine zusätzliche Vagusnervstimulation zu einer reduzierten CXCL1 mRNA Expression verglichen mit der LPS Gruppe und tendenziell auch der LPS+VGX Gruppe im Hypothalamus, sowie zu einer verminderten Interaktion NG mit ICAM-1 im Cortex. Diese Effekte könnten durch die Reduktion der Leptin Plasmakonzentration in der zusätzlich vagusnervstimulierten Gruppe entstehen, auch wenn ICAM-1 lediglich auf mRNA Ebene vermindert wurde, nicht jedoch auf Proteinebene. Demnach könnte eine Modulation von Leptin durch eine Vagusnervstimulation zu einer Regulation der zellulären Immunantwort nach LPS Stimulation im Gehirn beitragen.

5 Fazit und Ausblick

Die Effekte einer efferenten Vagusnervstimulation und einer Vagotomie auf die Immunantwort im Gehirn unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit zwischen dem Hypothalamus und dem Cortex. Im Cortex führte die Ausschaltung proinflammatorischer Afferenzen durch eine Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation zu einer Reduktion inflammatorischer Mediatoren (NF-IL6, I κ B α , SOCS3, CXCL1, ICAM-1 und COX2). Dies spiegelte sich jedoch in den neurophysiologischen Parametern, welche ebenfalls im Cortex erhoben wurden nicht direkt wider. So konnte gezeigt werden, dass eine efferente Vagusnervstimulation, im Gegensatz zu LPS alleine oder nach zusätzlicher Vagotomie, sowohl die zerebrale Mikrozirkulation in Form der evozierten

Flussantwort als auch die Gehirnfunktion in Form der SEP Amplituden stabilisierte. Somit konnten in der vorliegenden Arbeit die von Mihaylova et al. (2012) beschriebenen Effekte einer efferenten Vagusnervstimulation auf neurophysiologische Parameter bestätigt werden [325].

Im Gegensatz zum Cortex zeigten sich im Hypothalamus hingegen anti-inflammatorische Effekte einer efferenten Vagusnervstimulation auf unterschiedlichen Ebenen der Entzündungsreaktion.

So konnte als Anzeichen einer verminderten inflammatorischen Reaktion auf Ebene der Zytokine und Transkriptionsfaktoren eine Reduktion der LPS bedingten mRNA Expression von IL-6 im Cortex und Hypothalamus, sowie der NF-IL6 mRNA und Protein Expression im Hypothalamus beobachtet werden.

Außerdem ergaben sich durch eine Verminderung der COX2 mRNA Expression Hinweise darauf, dass eine efferente Vagusnervstimulation durch die Modulation des Arachidonsäuremetabolismus zu einer Stabilisierung der Mikrozirkulation beitragen könnte.

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine efferente Vagusnervstimulation auch die zelluläre Immunantwort im Gehirn beeinflusst. Die Vagusnervstimulation führte dabei zu einer verminderten LPS bedingten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf mRNA Ebene, nicht aber auf Proteinebene, und zu einer verminderten mRNA Expression des Chemokins CXCL1. Des Weiteren bewirkte die Vagusnervstimulation eine Reduktion der Leptin Plasmakonzentration. Dies liefert Hinweise auf eine verminderte Rekrutierung von Leukozyten ins Gehirn. Dennoch zeigten sich keine Unterschiede in der Anzahl NG im Cortex sowie im SFO und angrenzendem *Plexus choroideus*. Interessanterweise führte die Vagusnervstimulation jedoch zu einer signifikanten Verminderung der Kolokalisation NG mit ICAM-1 im Cortex. Dies deutet auf eine verminderte Interaktion zwischen NG und dem Endothel hin und könnte zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation und somit der untersuchten neurophysiologischen Parameter beitragen.

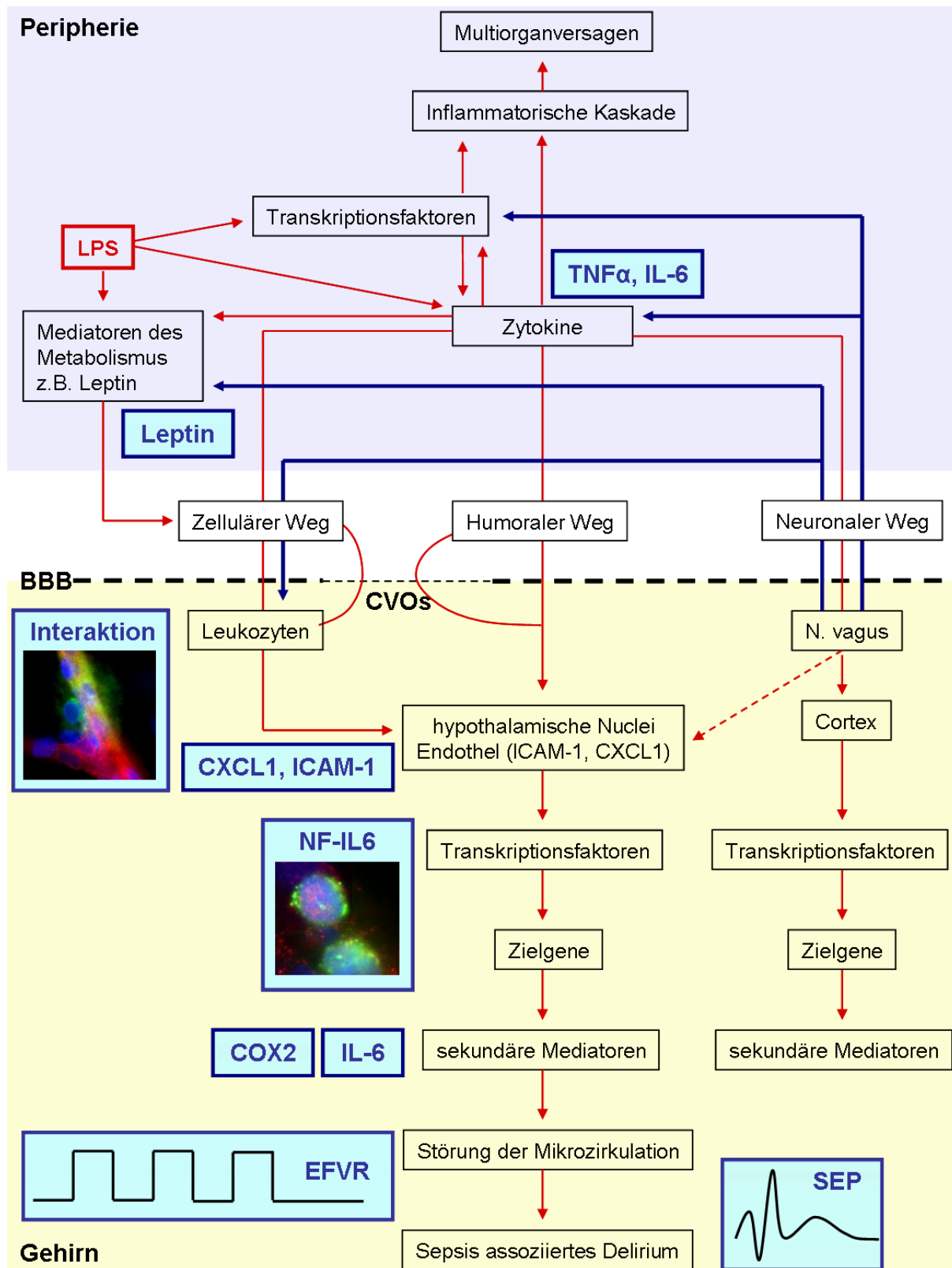


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Wirkung einer efferenten Vagusnervstimulation auf die inflammatorische Kaskade in der Peripherie und im Gehirn. Die Abbildung zeigt die bereits in Kapitel I 5 beschriebene Entzündungsreaktion in der Peripherie und im Gehirn nach LPS Applikation und die Effekte einer efferenten Vagusnervstimulation auf diese Inflammation.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vagusnervstimulation zu einer Stabilisierung der SEP Amplituden als Indikator der Gehirnfunktion und der evozierten Flussantwort als Indikator der zerebralen Mikrozirkulation führte und bestätigte somit die Ergebnisse von Mihaylova et al.

(2012). Um die zugrundeliegenden Mechanismen näher zu beleuchten wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene inflammatorische Mediatoren untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Vagusnervstimulation anti-inflammatorische Effekte auf unterschiedlichen Ebenen der inflammatorischen Kaskade ausübt. So führte eine efferente Vagusnervstimulation zu einer Hemmung proinflammatorischer Zytokine in der Peripherie. Dies trägt vermutlich über den humoralen Weg zur Abschwächung der inflammatorischen Kaskade im Gehirn bei. So konnte gezeigt werden, dass die Vagusnervstimulation zu einer Reduktion der IL-6 mRNA Expression im Hypothalamus und Cortex und zu einer Reduktion der NF-IL6 mRNA und Protein Expression im Hypothalamus führte. Zusätzlich bewirkte eine Vagusnervstimulation eine Modulation des zellulären Wegs, die sich in einer Verminderung des LPS bedingten Anstiegs der Leptin Plasmakonzentration, sowie einer Reduktion der mRNA Expression von ICAM-1 und CXCL1 im Hypothalamus äußerte. Dies ging zwar nicht mit einer verringerten Anzahl NG im Gehirn einher, führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Kolokalisation NG mit ICAM-1. Dies weist auf eine verminderte Interaktion NG mit dem Endothel hin und könnte ebenfalls zur Stabilisierung der Mikrozirkulation und Verminderung der Entzündungsreaktion im Gehirn beitragen. Des Weiteren bewirkte die Vagusnervstimulation eine Reduktion der COX2 Expression im Hypothalamus. Dies deutet daraufhin, dass die Vagusnervstimulation auch Einfluss auf den Arachidonsäuremetabolismus nehmen könnte. Arachidonsäurederivate sind wichtige Mediatoren der Mikrozirkulation und ihre Modulation durch den *N. vagus* könnte zur Protektion der Mikrozirkulation beitragen. Neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Faktoren könnten jedoch möglicherweise auch andere Mediatoren in der Peripherie oder auch im Gehirn durch die efferente Vagusnervstimulation moduliert werden und zu den anti-inflammatorischen Effekten beitragen.

Interessanterweise ergaben sich Unterschiede in der Wirkung einer Vagusnervstimulation und einer Vagotomie zwischen dem Cortex und dem Hypothalamus. Im Cortex führte die Ausschaltung proinflammatorischer Afferenzen durch eine Vagotomie unabhängig von einer zusätzlichen Vagusnervstimulation zu einer Reduktion inflammatorischer Mediatoren (NF-IL6, I κ B α , SOCS3, CXCL1, ICAM-1 und COX2). Dies lies sich jedoch in den neurophysiologischen Parametern, welche ebenfalls im Cortex erhoben wurden, nicht nachvollziehen.

LPS = Lipopolysaccharid, BBB = Blut-Hirn-Schranke, CVO = *Circumventrikuläres Organ*, TNF = Tumornekrosefaktor, IL = Interleukin, N. = *Nervus*, ICAM = intercellular adhesion molecule, COX = Cyclooxygenase, NF-IL6 = nuclear factor IL-6, EFVR = evoked flow velocity response, SEP = somatosensorisch evozierte Potentiale

Allerdings müsste eingehender geklärt werden, welche Relevanz die einzelnen Effekte der Vagusnervstimulation im Gehirn für die Verbesserung der neurophysiologischen Parameter haben. Dafür könnten in der Zukunft unter anderen die folgenden Punkte überprüft werden:

Erstens sollte die Rolle NG bei der Entstehung eines SAD untersucht werden. Dabei ist außerdem von Interesse, ob und in welchem Ausmaß eine efferente Vagusnervstimulation den Aktivierungsstatus, Phänotyp oder die Funktion NG beeinflusst.

Zweitens sollten mögliche Effekte einer Vagusnervstimulation auf den Arachidonsäuremetabolismus näher beleuchtet werden. Bei der Metabolisierung von Arachidonsäure entstehen neben Prostaglandinen auch andere vasoaktive Substanzen wie beispielsweise EETs, 20-HETE und andere, die als wichtige Mediatoren der neurovaskulären Kopplung fungieren können [27]. Ihre Beteiligung an der Entstehung

einer Mikrozirkulationsstörung und eine mögliche Modulation durch den *N. vagus* sollte deshalb weitergehend untersucht werden.

Drittens sollte die Rolle von Transkriptionsfaktoren für die Vermittlung der anti-inflammatorischen Effekte einer Vagusnervstimulation untersucht werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, beeinflusst eine efferente Vagusnervstimulation ein breites Spektrum der inflammatorischen Reaktion im Gehirn. Dazu gehört auch eine Modulation von Transkriptionsfaktoren wie NF-IL6 und möglicherweise auch STAT3 und NFκB. Diese Transkriptionsfaktoren wiederum regulieren die Expression zahlreicher Zielgene [92, 452, 474], sodass sie für eine Vermittlung breit gefächerter Effekte geeignet wären. Eine Modulation von STAT3 und NFκB im Gehirn durch eine efferente Vagusnervstimulation muss jedoch noch endgültig nachgewiesen werden.

Eine weitere spannende Frage ist, wie das anti-inflammatorische Signal aus der Peripherie in das Gehirn übertragen wird. Dabei scheint sowohl der humorale als auch der zelluläre Kommunikationsweg eine Rolle zu spielen. Welche Relevanz die einzelnen Wege jedoch haben und ob auch andere Faktoren daran beteiligt sein könnten ist dabei unbekannt. Einige Autoren beschreiben einen cholinergen anti-inflammatorischen Weg im Gehirn [143, 367-368, 451], wobei fraglich ist, wie das cholinerge Signal bei einer efferenten Vagusnervstimulation aus der Peripherie ins Gehirn gelangen könnte. Um jedoch den genauen Mechanismus der zentralen anti-inflammatorischen Wirkung der efferenten Vagusnervstimulation aufzuklären, wäre es dennoch wichtig diese Möglichkeiten zu überprüfen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine efferente Vagusnervstimulation sowohl in der Peripherie als auch im Hypothalamus anti-inflammatorische Effekte vermittelt. Deshalb scheint eine Vagusnervstimulation ein vielversprechender Therapieansatz für die Behandlung einer Sepsis und anderer inflammatorischer Erkrankungen darzustellen.

Erste Studien im Bereich der Humanmedizin ergaben jedoch kontroverse Resultate. So ergaben sich Hinweise auf anti-inflammatorische Effekte des *N. vagus* aus einigen Studien, welche die „heart rate variability“ (HRV) als Maß für die Vagusnervaktivität nutzten und eine inverse Korrelation zwischen der HRV und proinflammatorischen

Mediatoren zeigen konnten [108, 309, 457]. Andere Autoren konnten diesen Effekt jedoch nicht bestätigen [267, 270]. Des Weiteren zeigten vielversprechende Versuche mit dem cholinergen Agonisten GTS-21, dass dieser die Produktion inflammatorischer Zytokine in humanen mononuklearen Zellen aus dem peripheren Blut nach Stimulation mit TLR Agonisten verminderte [272]. Eine orale Applikation von GTS-21 führte jedoch zu einem sehr ungleichmäßigen Plasmaspiegel in den Probanden und erzielte keine anti-inflammatorischen Effekte nach LPS Applikation. Lediglich in Probanden mit sehr hohen GTS-21 Plasmaspiegeln konnte eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine beobachtet werden [269]. Der gleiche Autor beschrieb auch nach transvenöser Vagusnervstimulation keine Reduktion LPS induzierter Zytokine oder eine Abschwächung der grippeartigen Symptome in Freiwilligen [271]. Dahingegen konnten Rossi et al. (2012) zeigen, dass eine elektrische Stimulation des epikardialen vagalen ganglionären Plexus nach einem herzchirurgischen Eingriff eine signifikante Verminderung proinflammatorischer Mediatoren bewirkte [409].

Eine Vagusnervstimulation kann somit vermutlich prinzipiell auch im Menschen anti-inflammatorische Effekte vermitteln. Die Wirksamkeit scheint jedoch von der jeweiligen Situation abzuhängen. Um herauszufinden welchen Patienten und wann eine Vagusnervstimulation helfen könnte, ist es deshalb umso wichtiger die zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären. Des Weiteren scheint eine Vagusnervstimulation eher modulatorische Wirkungen auf das Immunsystem auszuüben. Bei Kenntnis der zugrundeliegenden Mechanismen, könnten diese eventuell als direktes Ziel einer therapeutischen Intervention dienen und sich dabei vielleicht sogar als effizienter erweisen als eine Vagusnervstimulation selber.

Außerdem sollte der Einsatz anticholinergischer Medikamente bei Patientengruppen mit erhöhtem Risiko der Entstehung einer Sepsis kritisch überdacht werden, da anticholinerge Medikamente die natürliche Regulation des angeborenen Immunsystems durch den *N. vagus* eventuell behindern könnten.

V. Zusammenfassung

Eine Sepsis stellt ein wichtiges medizinisches Problem dar, für das es bis heute keine zufriedenstellende Therapie gibt. Während einer Sepsis oder einer systemischen Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade, verbunden mit einer Störung der Mikrozirkulation, welche zu einer Minderversorgung diverser Organen führt und schließlich den Funktionsverlust dieser Organe bedingt. Aufgrund einer funktionellen Beeinträchtigung des Gehirns, treten während einer Sepsis häufig auch neurologische Symptome auf, die unter dem Begriff Sepsis assoziiertes Delirium zusammengefasst werden. Das Gehirn wird dabei jedoch nicht nur durch die inflammatorische Reaktion geschädigt, es kann, im Gegensatz zu anderen Organsystemen, über den *N. vagus* auch zur Modulation des Immunsystems beitragen. Vorangegangenen Studien zeigten anti-inflammatorische Effekte einer efferenten Vagusnervstimulation, die zu einer Stabilisierung der zerebralen Mikrozirkulation und der Gehirnfunktion führten. Des Weiteren scheint die Vagusnervstimulation modulatorisch auf die zelluläre Immunantwort im Blut und in der Milz zu wirken. Da die zugrundeliegenden Mechanismen jedoch noch weitgehend unbekannt sind, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Mechanismen näher zu beleuchten. Dabei lag der Schwerpunkt zum einen auf den neurophysiologischen Parametern, zum anderen aber auch auf inflammatorischen Markern in unterschiedlichen Gehirnregionen, Mediatoren der neurovaskulären Kopplung und der Migration von Immunzellen ins Gehirn während einer systemischen Entzündung.

Um eine systemische Entzündungsreaktion in Ratten zu induzieren erfolgte eine intravenöse Applikation von Lipopolysaccharid (LPS 5 mg/kg). Es erfolgte entweder keine Manipulation des *N. vagus*, eine beidseitige cervicale Vagotomie oder eine Vagotomie und eine Vagusnervstimulation des linken distalen Anteils des *N. vagus*. Als Indikator der zerebralen Mikrozirkulation und der Gehirnfunktion wurden die evozierte Flussantwort und die somatosensorisch evozierten Potentiale über einen Zeitraum von 4,5 Stunden erfasst. LPS bewirkte eine Reduktion der beiden neurophysiologischen Parameter, die durch eine zusätzliche Vagusnervstimulation verhindert werden konnte. Zusätzlich verringerte die vagale Stimulation die Konzentration peripherer inflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF α) und die zentrale

Expression von IL-6 und NF-IL6, was sowohl auf eine verringerte periphere als auch zentrale Entzündungsreaktion hinweist. Interessanterweise ergaben sich dabei Unterschiede in der Regulation der inflammatorischen Antwort im Cortex und im Hypothalamus, welche auf eine unterschiedliche Ansprechbarkeit auf humorale und neuronale Signale in diesen Regionen zurückzuführen ist. Eine Vagusnervstimulation führte außerdem zu einer verminderten Expression von COX2, einem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym für die Prostaglandin E Synthese. Dies legt nahe, dass eine Vagusnervstimulation unter inflammatorischen Bedingungen über die Modulation vasoaktiver Substanzen auch die neurovaskuläre Kopplung beeinflussen könnte.

Neben den Effekten auf humorale Faktoren beeinflusste die Vagusnervstimulation auch die zelluläre Immunantwort. LPS induzierte einen Anstieg der Plasmakonzentration des Neuroimmunmediators Leptin und eine vermehrte Expression von Extravasationssignalen („intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1), CXCL1)), sowie einen Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Gehirn und ihrer Kolokalisation mit ICAM-1. Interessanterweise führte die efferente Vagusnervstimulation hier zu einer Reduktion von Leptin und CXCL1 und verhinderte die LPS bedingte Kolokalisation neutrophiler Granulozyten mit ICAM-1.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse eine positive, anti-inflammatorische Wirkung der Vagusnervstimulation nahe, die durch eine verminderte inflammatorische Reaktion im Gehirn und einer verminderten Interaktion neutrophiler Granulozyten mit Endothelzellen des Gehirns zustande kommt.

VI. Summary

Sepsis is an important problem in the public health sector and until today there is no satisfying therapy for it. Sepsis or systemic inflammation leads to the activation of an inflammatory cascade which induces a disturbance of the microcirculation leading to an insufficient blood supply of various organs and finally to their functional failure. Because of the impairment of brain function sepsis is often accompanied by neurological symptoms, referred to as sepsis associated delirium. Importantly the brain is not only a victim of inflammatory processes but can also modulate the immune response via the vagus nerve. Previous experiments indicated that an efferent stimulation of the vagus nerve has anti-inflammatory effects stabilising brain microcirculation and brain function. Additionally it seems to modulate the cellular immune response in the blood and the spleen. However, the underlying mechanisms are still largely unknown. The current study aimed to clarify these mechanisms focused on neurophysiological parameters, inflammatory markers in different brain regions, mediators of the neurovascular coupling and leukocyte migration to the brain during systemic inflammation.

To induce endotoxemia an intravenous administration of lipopolysaccharide (LPS; 5 mg/kg) was used. Rats received either no manipulation of the vagus nerve, a cervical vagotomy or a cervical vagotomy and vagus nerve stimulation of the left distal trunk. As indicators of the cerebral microcirculation and brain function the evoked flow velocity response and somatosensory evoked potentials were measured for 4.5 h, respectively. LPS induced a decline of both neurophysiological parameters, which was prevented by vagal stimulation. Additionally vagus nerve stimulation decreased the concentration of peripheral pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF α) and the central expression of IL-6 and NF-IL6 indicating a reduced inflammatory response in the periphery and the brain. Interestingly, there was a diverging regulation of the inflammatory response in the cortex and the hypothalamus due to the different accessibility for humoral and neuronal communication pathways to these brain regions. Furthermore, vagal stimulation reduced the expression of COX2, the rate limiting enzyme for the prostaglandin E synthesis pointing to an influence on mediators of the neurovascular coupling.

Besides the effects on humoral mediators, vagus nerve stimulation also interfered with the cellular immune response. LPS induced an increased plasma concentration of the neuroimmune mediator leptin and the expression of extravasation signals (“intercellular adhesion molecule-1” (ICAM-1), CXCL1) as well as the number of neutrophil granulocytes in the brain and their colocalisation with ICAM-1. Interestingly, vagus nerve stimulation reduced the expression of CXCL1 and Leptin and prevented the colocalisation of neutrophil granulocytes and ICAM-1.

Overall, these results suggest beneficial and anti-inflammatory effects of efferent vagal stimulation on neurophysiological parameters that might be due to an attenuated inflammatory response in the brain and a reduced interaction of neutrophil granulocytes and brain endothelial cells.

VII. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AA	Arachidonsäure
ACh	Acetylcholin
Ak	Antikörper
ANOVA	„analysis of variance“
AP	Area postrema
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β_2 -Mikroglobulin
Bax	Bcl-2 associated X Protein
BBB	Blut-Hirn-Schranke
bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Canx	Calnexin
CARS	„compensatory anti-inflammatory response syndrome“
CCL	CCL Chemokine
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	„complementary DNA“ (komplementäre DNA)
ChAT ⁺ T-Zellen	Cholin Acetyltransferase positive T-Zellen
ChP	Plexus choroideus
CLP	„cecal ligation and puncture“
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
C _T -Wert	„cycle threshold“ / „threshold cycle“
CVO	Cirkumventrikuläres Organ
CXCL	CXC chemokine ligand
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochloride
DAMP	„danger associated molecular pattern“
DAPI	4'6-Diamidin-2'Phenylindol Dilaktat
db/db Maus	leptinrezeptordefiziente Maus
DC	dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	„double stranded DNA“ (Doppelsträngige DNA)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
e.V.	eingetragener Verein
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EEG	Elektroenzephalographie /Elektroenzephalogramm
EET	Epoxyeicosatriensäure
EFVR	„evoked flow velocity response“
ELANE	Elastase, „neutrophil expressed“

Abkürzungen

ELISA	„enzyme-linked immunsorbent assay“
ESL	E-selectin ligand
etc.	et cetera
FAM®	6-Carboxy-Fluoreszin
FELASA	„Federation of Laboratory Animal Science Associations“
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GlcN	Gucosamin
GLP	Glucagon like peptide
GTS-21	partieller nAChR Agonist
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hep	D-glycero-D-manno-heptose
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
HRV	„heart rate variability“
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM	„intercellular adhesion molecule“
IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1 Rezeptor Antagonist
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IQR	Interquartilsabstand
IκB	„inhibitor of κB“
JAK	Janus-Kinase
Kdo	2-Keto-3desoxyoctulosonic acid
KG	Körpergewicht
Ko	Kontrolle
LAP	„liver-enriched activating protein“
LDF	Laser Doppler Flussmessung
LFA	„lymphocyte function-associated antigen“
LIP	„liver-enriched inhibitory protein“
l-NIL	selektiver Hemmer der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase
LPS	Lipopolyssaccharid
M1	Makrophagen vom Typ M1
M2	Makrophagen vom Typ M2
Mac	„macrophage-1 antigen“
MAP	„mitogen activated protein“
ME	Eminentia mediana
MGB	„minor groove binder“
MGL	Monoacylglycerol Lipase
mGluR	metabotrope Glutamat Rezeptoren
miR	mikro RNA
M-MLV	„moloney murine leukemia virus“

Abkürzungen

MODS	„multi organ dysfunction syndrome“
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E Synthase
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	„messenger RNA“
MS	Multiple Sklerose
N.	Nervus
NA	Noradrenalin
NDS	„normal donkey serum“
NF-IL6	„nuclear factor Interleukin-6“
NFQ	„non-fluorescent quencher“
NFκB	„nuclear factor kappa B“
NG	neutrophile Granulozyten
NK	natürliche Killerzelle
NL	Neurohypophyse
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	„normal rat serum“
ob/ob Maus	leptindefiziente Maus
ObRa	kurze Form des Leptinrezeptors
ObRb	lange Form des Leptinrezeptors
OD	optische Dichte
OP	Operation
OVL	Organum vasculosum laminae terminalis
P	Phosphat /phosphoryliert
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCI	„peritoneal contamination and infection“
pCO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PECAM	„platelet/endothelial cell adhesion molecule“
PEEP	„positive endexpiratory pressure“ (positiver endexpiratorischer Druck)
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PIN	Glandula pinealis
PLA	Phospholipase A
pO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PSGL	„P-selectin glycoprotein ligand“
PVN	Nucleus paraventricularis
QC	Qualitätskontrolle
qRT-PCR	„quantitative reverse transcriptase PCR“
rel.	relative
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription

Abkürzungen

SAD	Sepsis assoziiertes Delirium
SCO	Organum subcommissurale
sCVO	sensorisches circumventrikuläres Organ
SEP	Somatosensorisch Evozierte Potentiale
SFO	Organum subfornicale
sIL-6R	löslicher IL-6 Rezeptor
SIRS	„systemic inflammatory response syndrome“
S-Le ^x	sialyl-Lewis x antigen
SOCS	„suppressor of cytokine signalling“
ssDNA	„single stranded DNA“ (Einzelsträngige DNA)
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
TACE	„tumor necrosis factor-alpha converting enzyme“
TBS	„tris-buffered saline“ (Tris gepufferte Salzlösung)
TGF	„transforming growth factor“
Th-Zellen	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TMD	Tetramethylbenzidin
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Trib1	Tribbles 1 (Serin/Threonin-Kinase)
Triton X-100	t-Octylphenooxypoly-Ethoxyethanol
U	unphosphoryliert
u.a.	und andere
UBC	Ubiquitin C
usw.	und so weiter
V.	Vena
VCAM	„vascular cell adhesion molecule“
VGX	Vagotomie
VLA	„very late antigen“
VNS	Vagusnervstimulation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
Zytokin-R	Zytokinrezeptor
α 7nAChR	α 7 nikotinerger Acetylcholinrezeptor
β aR	β adrenerge Rezeptoren

VIII. Literaturverzeichnis

- [1] N.J. Abbott, A.A. Patabendige, D.E. Dolman, S.R. Yusof, D.J. Begley, Structure and function of the blood-brain barrier, *Neurobiol Dis* 37 (2010) 13-25.
- [2] E. Abraham, Neutrophils and acute lung injury, *Crit Care Med* 31 (2003) S195-199.
- [3] E. Abraham, A. Anzueto, G. Gutierrez, S. Tessler, G. San Pedro, R. Wunderink, A. Dal Nogare, S. Nasraway, S. Berman, R. Cooney, H. Levy, R. Baughman, M. Rumbak, R.B. Light, L. Poole, R. Allred, J. Constant, J. Pennington, S. Porter, Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group, *Lancet* 351 (1998) 929-933.
- [4] E. Abraham, R. Baughman, E. Fletcher, S. Heard, J. Lamberti, H. Levy, L. Nelson, M. Rumbak, J. Steingrub, J. Taylor, Y.C. Park, J.M. Hynds, J. Freitag, Liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in acute respiratory distress syndrome: a controlled, randomized, double-blind, multicenter clinical trial. TLC C-53 ARDS Study Group, *Crit Care Med* 27 (1999) 1478-1485.
- [5] E. Abraham, P.F. Laterre, J. Garbino, S. Pingleton, T. Butler, T. Dugernier, B. Margolis, K. Kudsk, W. Zimmerli, P. Anderson, M. Reynaert, D. Lew, W. Lesslauer, S. Passe, P. Cooper, A. Burdeska, M. Modi, A. Leighton, M. Salgo, P. Van der Auwera, Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients, *Crit Care Med* 29 (2001) 503-510.
- [6] E. Abraham, K. Reinhart, S. Opal, I. Demeyer, C. Doig, A.L. Rodriguez, R. Beale, P. Svoboda, P.F. Laterre, S. Simon, B. Light, H. Spapen, J. Stone, A. Seibert, C. Peckelsen, C. De Deyne, R. Postier, V. Pettita, C.L. Sprung, A. Artigas, S.R. Percell, V. Shu, C. Zwingelstein, J. Tobias, L. Poole, J.C. Stolzenbach, A.A. Creasey, Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial, *JAMA* 290 (2003) 238-247.
- [7] N. Adam, S. Kandelman, J. Mantz, F. Chretien, T. Sharshar, Sepsis-induced brain dysfunction, *Expert Rev Anti Infect Ther* 11 (2013) 211-221.
- [8] A. Aguilar-Valles, J. Kim, S. Jung, B. Woodside, G.N. Luheshi, Role of brain transmigrating neutrophils in depression-like behavior during systemic infection, *Mol Psychiatry* 19 (2014) 599-606.
- [9] S.H. Ahmed, Y.Y. He, A. Nassief, J. Xu, X.M. Xu, C.Y. Hsu, F.M. Faraci, Effects of lipopolysaccharide priming on acute ischemic brain injury, *Stroke* 31 (2000) 193-199.
- [10] A. Akaike, S. Kaneko, Y. Tamura, N. Nakata, H. Shiomi, F. Ushikubi, S. Narumiya, Prostaglandin E2 protects cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity, *Brain Res* 663 (1994) 237-243.
- [11] S. Akira, H. Isshiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano, T. Kishimoto, A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family, *EMBO J* 9 (1990) 1897-1906.
- [12] R. Al-Ashy, I. Chakroun, M.E. El-Sabban, F.R. Homaidan, The role of NF-kappaB in mediating the anti-inflammatory effects of IL-10 in intestinal epithelial cells, *Cytokine* 36 (2006) 1-8.

- [13] C. Alexander, E.T. Rietschel, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, *J Endotoxin Res* 7 (2001) 167-202.
- [14] C. Allen, P. Thornton, A. Denes, B.W. McColl, A. Pierozynski, M. Monestier, E. Pinteaux, N.J. Rothwell, S.M. Allan, Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA, *J Immunol* 189 (2012) 381-392.
- [15] D. Altavilla, S. Guarini, A. Bitto, C. Mioni, D. Giuliani, A. Bigiani, G. Squadrito, L. Minutoli, F.S. Venuti, F. Messineo, V. De Meo, C. Bazzani, F. Squadrito, Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kappaB activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock, *Shock* 25 (2006) 500-506.
- [16] D. Altavilla, G. Squadrito, L. Minutoli, B. Deodato, A. Bova, A. Sardella, P. Seminara, M. Passaniti, G. Urna, S.F. Venuti, A.P. Caputi, F. Squadrito, Inhibition of nuclear factor-kappaB activation by IRFI 042, protects against endotoxin-induced shock, *Cardiovasc Res* 54 (2002) 684-693.
- [17] D. Amantea, G. Bagetta, C. Tassorelli, N.B. Mercuri, M.T. Corasaniti, Identification of distinct cellular pools of interleukin-1beta during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat, *Brain Res* 1313 (2010) 259-269.
- [18] S.C. Amruthesh, M.F. Boerschel, J.S. McKinney, K.A. Willoughby, E.F. Ellis, Metabolism of arachidonic acid to epoxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and prostaglandins in cultured rat hippocampal astrocytes, *J Neurochem* 61 (1993) 150-159.
- [19] C. An, Y. Shi, P. Li, X. Hu, Y. Gan, R.A. Stetler, R.K. Leak, Y. Gao, B.L. Sun, P. Zheng, J. Chen, Molecular dialogs between the ischemic brain and the peripheral immune system: dualistic roles in injury and repair, *Prog Neurobiol* 115 (2014) 6-24.
- [20] B.M. Ances, J.A. Detre, K. Takahashi, J.H. Greenberg, Transcranial laser doppler mapping of activation flow coupling of the rat somatosensory cortex, *Neurosci Lett* 257 (1998) 25-28.
- [21] B.M. Ances, J.H. Greenberg, J.A. Detre, W.D. Dietrich, Acute carotid occlusion alters the activation flow coupling response to forepaw stimulation in a rat model, *Stroke* 31 (2000) 955-960.
- [22] S.T. Anderson, S. Commins, P.N. Moynagh, A.N. Coogan, Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse, *Brain Behav Immun* 43C (2015) 98-109.
- [23] D.C. Angus, M.C. Birmingham, R.A. Balk, P.J. Scannon, D. Collins, J.A. Kruse, D.R. Graham, H.V. Dedhia, S. Homann, N. MacIntyre, E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators, *JAMA* 283 (2000) 1723-1730.
- [24] D.C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock, *N Engl J Med* 369 (2013) 840-851.
- [25] F. Arnalich, E. Garcia-Palomero, J. Lopez, M. Jimenez, R. Madero, J. Renart, J.J. Vazquez, C. Montiel, Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis, *Infect Immun* 68 (2000) 1942-1945.
- [26] D.M. Aronoff, Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death?, *Mediators Inflamm* 2012 (2012) 696897.

- [27] D. Attwell, A.M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B.A. Macvicar, E.A. Newman, Glial and neuronal control of brain blood flow, *Nature* 468 (2010) 232-243.
- [28] A. Ayala, C.S. Chung, G.Y. Song, I.H. Chaudry, IL-10 mediation of activation-induced TH1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis, *Cytokine* 14 (2001) 37-48.
- [29] P.A. Baeuerle, D. Baltimore, NF-kappa B: ten years after, *Cell* 87 (1996) 13-20.
- [30] C.A. Baez-Pagan, M. Delgado-Velez, J.A. Lasalde-Dominicci, Activation of the Macrophage alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation, *J Neuroimmune Pharmacol* (2015).
- [31] J.J. Bajramovic, Regulation of innate immune responses in the central nervous system, *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10 (2011) 4-24.
- [32] J. Bakker, M. Coffernils, M. Leon, P. Gris, J.L. Vincent, Blood lactate levels are superior to oxygen-derived variables in predicting outcome in human septic shock, *Chest* 99 (1991) 956-962.
- [33] G.U. Balis, R.R. Monroe, The pharmacology of chloralose. A review, *Psychopharmacologia* 6 (1964) 1-30.
- [34] W.A. Banks, Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology, *Curr Pharm Des* 11 (2005) 973-984.
- [35] W.A. Banks, A.J. Kastin, E.G. Gutierrez, Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier, *Neurosci Lett* 179 (1994) 53-56.
- [36] W.A. Banks, L. Ortiz, S.R. Plotkin, A.J. Kastin, Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism, *J Pharmacol Exp Ther* 259 (1991) 988-996.
- [37] W. Barakat, O. Herrmann, B. Baumann, M. Schwaninger, NF-kappaB induces PGE2-synthesizing enzymes in neurons, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380 (2009) 153-160.
- [38] T. Barkhausen, T. Tschernig, P. Rosenstiel, M. van Griensven, R.P. Vonberg, M. Dorsch, A. Mueller-Heine, A. Chalaris, J. Scheller, S. Rose-John, D. Seegert, C. Krettek, G.H. Waetzig, Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model, *Crit Care Med* 39 (2011) 1407-1413.
- [39] B.E. Barton, J.V. Jackson, Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model, *Infect Immun* 61 (1993) 1496-1499.
- [40] K. Baruch, M. Schwartz, CNS-specific T cells shape brain function via the choroid plexus, *Brain Behav Immun* 34 (2013) 11-16.
- [41] T. Basler, A. Meier-Hellmann, D. Bredle, K. Reinhart, Amino acid imbalance early in septic encephalopathy, *Intensive Care Med* 28 (2002) 293-298.
- [42] D.J. Begley, ABC transporters and the blood-brain barrier, *Curr Pharm Des* 10 (2004) 1295-1312.
- [43] D.L. Bellinger, D. Lorton, R.W. Hamill, S.Y. Felten, D.L. Felten, Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervation, *Brain Behav Immun* 7 (1993) 191-204.

- [44] E.E. Benarroch, Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications, *Neurology* 77 (2011) 1198-1204.
- [45] E.E. Benarroch, Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury, *Neurology* 81 (2013) 1079-1088.
- [46] R.M. Berg, K. Moller, D.M. Bailey, Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis, *J Cereb Blood Flow Metab* 31 (2011) 1532-1544.
- [47] G.R. Bernard, A.P. Wheeler, J.A. Russell, R. Schein, W.R. Summer, K.P. Steinberg, W.J. Fulkerson, P.E. Wright, B.W. Christman, W.D. Dupont, S.B. Higgins, B.B. Swindell, The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group, *N Engl J Med* 336 (1997) 912-918.
- [48] T.R. Bernik, S.G. Friedman, M. Ochani, R. DiRaimo, L. Ulloa, H. Yang, S. Sudan, C.J. Czura, S.M. Ivanova, K.J. Tracey, Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway, *J Exp Med* 195 (2002) 781-788.
- [49] E. Bernzweig, J.B. Payne, R.A. Reinhardt, J.K. Dyer, K.D. Patil, Nicotine and smokeless tobacco effects on gingival and peripheral blood mononuclear cells, *J Clin Periodontol* 25 (1998) 246-252.
- [50] B. Beutler, I.W. Milsark, A.C. Cerami, Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*, 1985, 229(4716):869-871. Classical article, *J Immunol* 181 (2008) 7-9.
- [51] M. Beyrau, J.V. Bodkin, S. Nourshargh, Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity, *Open Biol* 2 (2012) 120134.
- [52] P. Bezzi, G. Carmignoto, L. Pasti, S. Vesce, D. Rossi, B.L. Rizzini, T. Pozzan, A. Volterra, Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes, *Nature* 391 (1998) 281-285.
- [53] P. Bezzi, M. Domercq, L. Brambilla, R. Galli, D. Schols, E. De Clercq, A. Vescovi, G. Bagetta, G. Kollias, J. Meldolesi, A. Volterra, CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity, *Nat Neurosci* 4 (2001) 702-710.
- [54] K.L. Black, J.T. Hoff, Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats, *Ann Neurol* 18 (1985) 349-351.
- [55] C.M. Blatteis, Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management, *Pharmacol Ther* 111 (2006) 194-223.
- [56] C.M. Blatteis, S.L. Bealer, W.S. Hunter, Q.J. Llanos, R.A. Ahokas, T.A. Mashburn, Jr., Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs, *Brain Res Bull* 11 (1983) 519-526.
- [57] R.M. Bluthé, B. Michaud, K.W. Kelley, R. Dantzer, Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally, *Neuroreport* 7 (1996) 1485-1488.
- [58] R.M. Bluthé, V. Walter, P. Parnet, S. Laye, J. Lestage, D. Verrier, S. Poole, B.E. Stenning, K.W. Kelley, R. Dantzer, Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism, *C R Acad Sci III* 317 (1994) 499-503.

- [59] L. Bo, F. Wang, J. Zhu, J. Li, X. Deng, Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis, *Crit Care* 15 (2011) R58.
- [60] R.J. Boado, W.M. Pardridge, Glucose deprivation causes posttranscriptional enhancement of brain capillary endothelial glucose transporter gene expression via GLUT1 mRNA stabilization, *J Neurochem* 60 (1993) 2290-2296.
- [61] J.G. Bode, A. Nimmesgern, J. Schmitz, F. Schaper, M. Schmitt, W. Frisch, D. Haussinger, P.C. Heinrich, L. Graeve, LPS and TNF α induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages, *FEBS Lett* 463 (1999) 365-370.
- [62] J.F. Bogie, P. Stinissen, J.J. Hendriks, Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis, *Acta Neuropathol* 128 (2014) 191-213.
- [63] M. Bohatschek, A. Werner, G. Raivich, Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency, *Exp Neurol* 172 (2001) 137-152.
- [64] H. Bohrer, F. Qiu, T. Zimmermann, Y. Zhang, T. Jllmer, D. Mannel, B.W. Bottiger, D.M. Stern, R. Waldherr, H.D. Saeger, R. Ziegler, A. Bierhaus, E. Martin, P.P. Nawroth, Role of NFkappaB in the mortality of sepsis, *J Clin Invest* 100 (1997) 972-985.
- [65] Y.R. Boisclair, J. Wang, J. Shi, K.R. Hurst, G.T. Ooi, Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1 β on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells, *J Biol Chem* 275 (2000) 3841-3847.
- [66] C. Boland, V. Collet, E. Laterre, C. Lecuivre, X. Wittebole, P.F. Laterre, Electrical vagus nerve stimulation and nicotine effects in peritonitis-induced acute lung injury in rats, *Inflammation* 34 (2011) 29-35.
- [67] R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, W.J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992, *Chest* 136 (2009) e28.
- [68] G. Bonvento, R. Charbonne, J.L. Correze, J. Borredon, J. Seylaz, P. Lacombe, Is alpha-chloralose plus halothane induction a suitable anesthetic regimen for cerebrovascular research?, *Brain Res* 665 (1994) 213-221.
- [69] J.S. Boomer, J.M. Green, R.S. Hotchkiss, The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer?, *Virulence* 5 (2014) 45-56.
- [70] L.V. Borovikova, S. Ivanova, D. Nardi, M. Zhang, H. Yang, M. Ombrellino, K.J. Tracey, Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation, *Auton Neurosci* 85 (2000) 141-147.
- [71] L.V. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G.I. Botchkina, L.R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J.W. Eaton, K.J. Tracey, Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin, *Nature* 405 (2000) 458-462.
- [72] M. Bosmann, J.V. Sarma, G. Atefi, F.S. Zetoune, P.A. Ward, Evidence for anti-inflammatory effects of C5a on the innate IL-17A/IL-23 axis, *FASEB J* 26 (2012) 1640-1651.
- [73] M. Bosmann, P.A. Ward, Therapeutic potential of targeting IL-17 and IL-23 in sepsis, *Clin Transl Med* 1 (2012) 4.

- [74] B.O. Bratton, D. Martelli, M.J. McKinley, D. Trevaks, C.R. Anderson, R.M. McAllen, Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons, *Exp Physiol* 97 (2012) 1180-1185.
- [75] C.D. Breder, M. Tsujimoto, Y. Terano, D.W. Scott, C.B. Saper, Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system, *J Comp Neurol* 337 (1993) 543-567.
- [76] K.A. Brown, S.D. Brain, J.D. Pearson, J.D. Edgeworth, S.M. Lewis, D.F. Treacher, Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis, *Lancet* 368 (2006) 157-169.
- [77] F.M. Brunkhorst, C. Engel, F. Bloos, A. Meier-Hellmann, M. Ragaller, N. Weiler, O. Moerer, M. Gruendling, M. Oppert, S. Grond, D. Olthoff, U. Jaschinski, S. John, R. Rossaint, T. Welte, M. Schaefer, P. Kern, E. Kuhnt, M. Kiehntopf, C. Hartog, C. Natanson, M. Loeffler, K. Reinhart, Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis, *N Engl J Med* 358 (2008) 125-139.
- [78] F.M. Brunkhorst, C. Engel, K. Reinhart, H.-G. Bone, R. Brunkhorst, H. Burchardi, K.-U. Eckhardt, H. Forst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gründling, G. Huhle, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, W. Seeger, F. Stüber, N. Weiler, T. Welte, M. and Loeffler, Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany - results from the German "Prevalence" Study for the German Competence Network Sepsis (SepNet). *Critical Care* 9(Suppl 1) (2005).
- [79] N.J. Buchner H (Ed.), *Evozierte Potenziale, Neurovegetative Diagnostik, Okulographie*, Georg Thieme Verlag, 2005.
- [80] D.C. Bullard, X. Hu, T.R. Schoeb, R.G. Collins, A.L. Beaudet, S.R. Barnum, Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell types for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 178 (2007) 851-857.
- [81] M.D. Burton, N.L. Sparkman, R.W. Johnson, Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior, *J Neuroinflammation* 8 (2011) 54.
- [82] K.O. Busman-Sahay, T. Walrath, S. Huber, W. O'Connor, Jr., Cytokine crowdsourcing: multicellular production of TH17-associated cytokines, *J Leukoc Biol* 97 (2015) 499-510.
- [83] N. Busso, A. So, V. Chobaz-Peclat, C. Morard, E. Martinez-Soria, D. Talabot-Ayer, C. Gabay, Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis, *J Immunol* 168 (2002) 875-882.
- [84] C. Cailotto, P.J. Gomez-Pinilla, L.M. Costes, J. van der Vliet, M. Di Giovangiulio, A. Nemethova, G. Matteoli, G.E. Boeckxstaens, Neuro-anatomical evidence indicating indirect modulation of macrophages by vagal efferents in the intestine but not in the spleen, *PLoS One* 9 (2014) e87785.
- [85] F. Caldefie-Chezet, A. Poulin, M.P. Vasson, Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils, *Free Radic Res* 37 (2003) 809-814.
- [86] L. Calvillo, E. Vanoli, E. Andreoli, A. Besana, E. Omodeo, M. Gneccchi, P. Zerbi, G. Vago, G. Busca, P.J. Schwartz, Vagal stimulation, through its nicotinic action, limits infarct size and the inflammatory response to myocardial ischemia and reperfusion, *J Cardiovasc Pharmacol* 58 (2011) 500-507.

- [87] S.W. Canna, E.M. Behrens, Making sense of the cytokine storm: a conceptual framework for understanding, diagnosing, and treating hemophagocytic syndromes, *Pediatr Clin North Am* 59 (2012) 329-344.
- [88] C. Cappello, A. Zwergal, S. Kancierski, S.C. Haas, J.D. Kandemir, R. Huber, S. Page, K. Brand, C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha, *Cell Signal* 21 (2009) 1918-1924.
- [89] J.R. Cardinaux, I. Allaman, P.J. Magistretti, Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes, *Glia* 29 (2000) 91-97.
- [90] R.A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, D.E. Wolf, Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 8790-8794.
- [91] M.C. Carmona, E. Hondares, M.L. Rodriguez de la Concepcion, V. Rodriguez-Sureda, J. Peinado-Onsurbe, V. Poli, R. Iglesias, F. Villarroya, M. Giralt, Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBPbeta, *Biochem J* 389 (2005) 47-56.
- [92] R.L. Carpenter, H.W. Lo, STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers, *Cancers (Basel)* 6 (2014) 897-925.
- [93] K.M. Catron, J.R. Brickwood, C. Shang, Y. Li, M.F. Shannon, T.P. Parks, Cooperative binding and synergistic activation by RelA and C/EBPbeta on the intercellular adhesion molecule-1 promoter, *Cell Growth Differ* 9 (1998) 949-959.
- [94] S. Chakravarty, M. Herkenham, Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines, *J Neurosci* 25 (2005) 1788-1796.
- [95] P.K. Chatterjee, Y. Al-Abed, B. Sherry, C.N. Metz, Cholinergic agonists regulate JAK2/STAT3 signaling to suppress endothelial cell activation, *Am J Physiol Cell Physiol* 297 (2009) C1294-1306.
- [96] C.G. Chelazzi C, De Gaudio AR, Sepsis associated encephalopathy, *Current Anaesthesia & Critical Care* 19 (2008) 15-21.
- [97] C. Chen, Y. Zhang, Z. Du, M. Zhang, L. Niu, Y. Wang, J. Li, Vagal efferent fiber stimulation ameliorates pulmonary microvascular endothelial cell injury by downregulating inflammatory responses, *Inflammation* 36 (2013) 1567-1575.
- [98] R. Chinery, J.A. Brockman, D.T. Dransfield, R.J. Coffey, Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299, *J Biol Chem* 272 (1997) 30356-30361.
- [99] L. Churchill, P. Taishi, M. Wang, J. Brandt, C. Cearley, A. Rehman, J.M. Krueger, Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha, *Brain Res* 1120 (2006) 64-73.
- [100] L. Ciesielski, B. Modzelewski, Pathogenesis and treatment of multiorgan failure dysfunction syndrome in shock, *Rocz Akad Med Bialymst* 40 (1995) 13-24.
- [101] B.H. Clausen, K.L. Lambertsen, A.A. Babcock, T.H. Holm, F. Dagnaes-Hansen, B. Finsen, Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice, *J Neuroinflammation* 5 (2008) 46.

- [102] S. Cohen, P.E. Bigazzi, T. Yoshida, Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production, *Cell Immunol* 12 (1974) 150-159.
- [103] E.S. Connolly, Jr., C.J. Winfree, T.A. Springer, Y. Naka, H. Liao, S.D. Yan, D.M. Stern, R.A. Solomon, J.C. Gutierrez-Ramos, D.J. Pinsky, Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke, *J Clin Invest* 97 (1996) 209-216.
- [104] B. Conti, I. Tabarean, C. Andrei, T. Bartfai, Cytokines and fever, *Front Biosci* 9 (2004) 1433-1449.
- [105] A.H. Coons, Fluorescent antibody methods, *Gen Cytochem Methods* 1 (1958) 399-422.
- [106] A.L. Cooper, S. Brouwer, A.V. Turnbull, G.N. Luheshi, S.J. Hopkins, S.L. Kunkel, N.J. Rothwell, Tumor necrosis factor-alpha and fever after peripheral inflammation in the rat, *Am J Physiol* 267 (1994) R1431-1436.
- [107] K.E. Cooper, W.I. Cranston, A.J. Honour, Observations on the site & mode of action of pyrogens in the rabbit brain, *J Physiol* 191 (1967) 325-337.
- [108] T.M. Cooper, P.S. McKinley, T.E. Seeman, T.H. Choo, S. Lee, R.P. Sloan, Heart rate variability predicts levels of inflammatory markers: Evidence for the vagal anti-inflammatory pathway, *Brain Behav Immun* 49 (2015) 94-100.
- [109] J. Creteur, D. De Backer, Y. Sakr, M. Koch, J.L. Vincent, Sublingual capnometry tracks microcirculatory changes in septic patients, *Intensive Care Med* 32 (2006) 516-523.
- [110] L. Cronin, D.J. Cook, J. Carlet, D.K. Heyland, D. King, M.A. Lansang, C.J. Fisher, Jr., Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature, *Crit Care Med* 23 (1995) 1430-1439.
- [111] P. Damas, A. Reuter, P. Gysen, J. Demonty, M. Lamy, P. Franchimont, Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans, *Crit Care Med* 17 (1989) 975-978.
- [112] J. Damm, Charakterisierung der Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome in der Ratte. VVB Lauferweiler,, Giessen, 2012, pp. Online-Ressource.
- [113] J. Damm, G.N. Luheshi, R. Gerstberger, J. Roth, C. Rummel, Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction, *J Comp Neurol* 519 (2011) 480-505.
- [114] R. Dantzer, Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?, *Brain Behav Immun* 15 (2001) 7-24.
- [115] R. Dantzer, J.P. Konsman, R.M. Bluthé, K.W. Kelley, Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent?, *Auton Neurosci* 85 (2000) 60-65.
- [116] V. Darsalia, D. Nathanson, T. Nystrom, T. Klein, A. Sjöholm, C. Patrone, GLP-1R activation for the treatment of stroke: updating and future perspectives, *Rev Endocr Metab Disord* 15 (2014) 233-242.
- [117] D. De Backer, Hemodynamic management of septic shock, *Curr Infect Dis Rep* 8 (2006) 366-372.

- [118] D. De Backer, J. Creteur, J.C. Preiser, M.J. Dubois, J.L. Vincent, Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis, *Am J Respir Crit Care Med* 166 (2002) 98-104.
- [119] D. De Backer, K. Donadello, R. Favory, Link between coagulation abnormalities and microcirculatory dysfunction in critically ill patients, *Curr Opin Anaesthesiol* 22 (2009) 150-154.
- [120] D. De Backer, K. Donadello, Y. Sakr, G. Ospina-Tascon, D. Salgado, S. Scolletta, J.L. Vincent, Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome, *Crit Care Med* 41 (2013) 791-799.
- [121] D. De Backer, D. Orbegozo Cortes, K. Donadello, J.L. Vincent, Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock, *Virulence* 5 (2014) 73-79.
- [122] W.J. de Jonge, E.P. van der Zanden, F.O. The, M.F. Bijlsma, D.J. van Westerloo, R.J. Bennink, H.R. Berthoud, S. Uematsu, S. Akira, R.M. van den Wijngaard, G.E. Boeckxstaens, Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway, *Nat Immunol* 6 (2005) 844-851.
- [123] R. De Simone, M.A. Ajmone-Cat, D. Carnevale, L. Minghetti, Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures, *J Neuroinflammation* 2 (2005) 4.
- [124] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C.G. Figdor, J.E. de Vries, Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, *J Exp Med* 174 (1991) 1209-1220.
- [125] R. de Waal Malefyt, J. Haanen, H. Spits, M.G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, J.E. de Vries, Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression, *J Exp Med* 174 (1991) 915-924.
- [126] J.M. Debets, R. Kampmeijer, M.P. van der Linden, W.A. Buurman, C.J. van der Linden, Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients, *Crit Care Med* 17 (1989) 489-494.
- [127] B. Debnath, S. Xu, N. Neamati, Small molecule inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) protein, *J Med Chem* 55 (2012) 6645-6668.
- [128] L. Dejager, I. Pinheiro, E. Dejonckheere, C. Libert, Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?, *Trends Microbiol* 19 (2011) 198-208.
- [129] P. Descombes, U. Schibler, A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA, *Cell* 67 (1991) 569-579.
- [130] J.A. Detre, B.M. Ances, K. Takahashi, J.H. Greenberg, Signal averaged laser Doppler measurements of activation-flow coupling in the rat forepaw somatosensory cortex, *Brain Res* 796 (1998) 91-98.
- [131] J.A. DiDonato, M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, M. Karin, A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB, *Nature* 388 (1997) 548-554.
- [132] K. Dinkel, F.S. Dhabhar, R.M. Sapolsky, Neurotoxic effects of polymorphonuclear granulocytes on hippocampal primary cultures, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 331-336.

- [133] U. Dirnagl, B. Kaplan, M. Jacewicz, W. Pulsinelli, Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model, *J Cereb Blood Flow Metab* 9 (1989) 589-596.
- [134] U. Dirnagl, U. Lindauer, A. Villringer, Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats, *Neurosci Lett* 149 (1993) 43-46.
- [135] U. Dirnagl, K. Niwa, U. Lindauer, A. Villringer, Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide, *Am J Physiol* 267 (1994) H296-301.
- [136] M. Dlaska, G. Weiss, Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression, *J Immunol* 162 (1999) 6171-6177.
- [137] G.J. Dockray, Enteroendocrine cell signalling via the vagus nerve, *Curr Opin Pharmacol* 13 (2013) 954-958.
- [138] G.A. Donovan, I.R. Dohoo, D.M. Montgomery, F.L. Bennett, Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA, *Prev Vet Med* 34 (1998) 31-46.
- [139] D.J. Drucker, The role of gut hormones in glucose homeostasis, *J Clin Invest* 117 (2007) 24-32.
- [140] L.G. Dubois, L. Campanati, C. Righy, I. D'Andrea-Meira, T.C. Spohr, I. Porto-Carreiro, C.M. Pereira, J. Balca-Silva, S.A. Kahn, M.F. DosSantos, A. Oliveira Mde, A. Ximenes-da-Silva, M.C. Lopes, E. Faveret, E.L. Gasparetto, V. Moura-Neto, Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier, *Front Cell Neurosci* 8 (2014) 418.
- [141] D.M. Duffy, R.L. Stouffer, The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle, *Mol Hum Reprod* 7 (2001) 731-739.
- [142] M.L. Dustin, R. Rothlein, A.K. Bhan, C.A. Dinarello, T.A. Springer, Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1), *J Immunol* 137 (1986) 245-254.
- [143] J. Egea, I. Buendia, E. Parada, E. Navarro, R. Leon, M.G. Lopez, Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection, *Biochem Pharmacol* (2015).
- [144] A. Ejarque-Ortiz, M.G. Medina, J.M. Tusell, A.P. Perez-Gonzalez, J. Serratos, J. Saura, Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia, *Glia* 55 (2007) 178-188.
- [145] D.F. Emerich, A.V. Vasconcellos, R.B. Elliott, S.J. Skinner, C.V. Borlongan, The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation, *Expert Opin Biol Ther* 4 (2004) 1191-1201.
- [146] D. Engblom, M. Ek, S. Saha, A. Ericsson-Dahlstrand, P.J. Jakobsson, A. Blomqvist, Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier, *J Mol Med (Berl)* 80 (2002) 5-15.
- [147] C. Engel, F.M. Brunkhorst, H.G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, K. Reinhart, Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study, *Intensive Care Med* 33 (2007) 606-618.

- [148] B. Engelhardt, K. Wolburg-Buchholz, H. Wolburg, Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation, *Microsc Res Tech* 52 (2001) 112-129.
- [149] L. Engstrom, J. Ruud, A. Eskilsson, A. Larsson, L. Mackerlova, U. Kugelberg, H. Qian, A.M. Vasilache, P. Larsson, D. Engblom, M. Sigvardsson, J.I. Jonsson, A. Blomqvist, Lipopolysaccharide-induced fever depends on prostaglandin E2 production specifically in brain endothelial cells, *Endocrinology* 153 (2012) 4849-4861.
- [150] E. Engvall, P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry* 8 (1971) 871-874.
- [151] C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I.R. Poxton, Structure and function of lipopolysaccharides, *Microbes Infect* 4 (2002) 837-851.
- [152] Z. Fabry, M.M. Waldschmidt, D. Hendrickson, J. Keiner, L. Love-Homan, F. Takei, M.N. Hart, Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55, *J Neuroimmunol* 36 (1992) 1-11.
- [153] R. Faggioni, G. Fantuzzi, J. Fuller, C.A. Dinarello, K.R. Feingold, C. Grunfeld, IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation, *Am J Physiol* 274 (1998) R204-208.
- [154] M. Fang, H. Dai, G. Yu, F. Gong, Gene delivery of SOCS3 protects mice from lethal endotoxic shock, *Cell Mol Immunol* 2 (2005) 373-377.
- [155] I. Farquhar, C.M. Martin, C. Lam, R. Potter, C.G. Ellis, W.J. Sibbald, Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis, *J Surg Res* 61 (1996) 190-196.
- [156] G. Fecteau, B.P. Smith, L.W. George, Septicemia and meningitis in the newborn calf, *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25 (2009) 195-208, vii-viii.
- [157] J. Fenstermacher, P. Gross, N. Sposito, V. Acuff, S. Pettersen, K. Gruber, Structural and functional variations in capillary systems within the brain, *Ann N Y Acad Sci* 529 (1988) 21-30.
- [158] A. Fergus, K.S. Lee, Regulation of cerebral microvessels by glutamatergic mechanisms, *Brain Res* 754 (1997) 35-45.
- [159] J.A. Filosa, H.W. Morrison, J.A. Iddings, W. Du, K.J. Kim, Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone, *Neuroscience* (2015).
- [160] D.S. Finbloom, K.D. Winestock, IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes, *J Immunol* 155 (1995) 1079-1090.
- [161] M.A. Flierl, D. Rittirsch, H. Gao, L.M. Hoesel, B.A. Nadeau, D.E. Day, F.S. Zetoune, J.V. Sarma, M.S. Huber-Lang, J.L. Ferrara, P.A. Ward, Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis, *FASEB J* 22 (2008) 2198-2205.
- [162] M. Font-Nieves, M.G. Sans-Fons, R. Gorina, E. Bonfill-Teixidor, A. Salas-Perdomo, L. Marquez-Kisinousky, T. Santalucia, A.M. Planas, Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes, *J Biol Chem* 287 (2012) 6454-6468.
- [163] F. Fossiez, O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J.J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P.

- Golstein, J. Banchereau, S. Lebecque, T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines, *J Exp Med* 183 (1996) 2593-2603.
- [164] K. Frei, U.V. Malipiero, T.P. Leist, R.M. Zinkernagel, M.E. Schwab, A. Fontana, On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases, *Eur J Immunol* 19 (1989) 689-694.
- [165] A. Freitas, J.C. Alves-Filho, T. Victoni, T. Secher, H.P. Lemos, F. Sonogo, F.Q. Cunha, B. Ryffel, IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis, *J Immunol* 182 (2009) 7846-7854.
- [166] M.A. Freudenberg, C. Galanos, Interaction of lipopolysaccharides and lipid A with complement in rats and its relation to endotoxicity, *Infect Immun* 19 (1978) 875-882.
- [167] Z.G. Fridlender, J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G.S. Worthen, S.M. Albelda, Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN, *Cancer Cell* 16 (2009) 183-194.
- [168] J.M. Friedman, Leptin, leptin receptors, and the control of body weight, *Nutr Rev* 56 (1998) s38-46; discussion s54-75.
- [169] J. Gauldie, C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp, H. Baumann, Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 7251-7255.
- [170] L. Gautron, R. Mingam, A. Moranis, C. Combe, S. Laye, Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipopolysaccharide-induced anorexia in rats, *Neuroscience* 134 (2005) 933-946.
- [171] R.P. Gaykema, I. Dijkstra, F.J. Tilders, Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion, *Endocrinology* 136 (1995) 4717-4720.
- [172] R.P. Gaykema, L.E. Goehler, F.J. Tilders, J.G. Bol, M. McGorry, M. Fleshner, S.F. Maier, L.R. Watkins, Bacterial endotoxin induces fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve, *Neuroimmunomodulation* 5 (1998) 234-240.
- [173] B.C. Geyer, S. Ben Ari, S. Barbash, J. Kilbourne, T.S. Mor, H. Soreq, Nicotinic stimulation induces Tristetraprolin over-production and attenuates inflammation in muscle, *Biochim Biophys Acta* 1823 (2012) 368-378.
- [174] J.F. Gherzi-Egea, N. Strazielle, Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus, *Microsc Res Tech* 52 (2001) 83-88.
- [175] I.A. Giebelen, D.J. van Westerloo, G.J. LaRosa, A.F. de Vos, T. van der Poll, Stimulation of alpha 7 cholinergic receptors inhibits lipopolysaccharide-induced neutrophil recruitment by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism, *Shock* 27 (2007) 443-447.
- [176] K. Gil, A. Bugajski, M. Kurnik, P. Thor, Chronic vagus nerve stimulation reduces body fat, blood cholesterol and triglyceride levels in rats fed a high-fat diet, *Folia Med Cracov* 52 (2012) 79-96.
- [177] K. Gil, A. Bugajski, P. Thor, Electrical vagus nerve stimulation decreases food consumption and weight gain in rats fed a high-fat diet, *J Physiol Pharmacol* 62 (2011) 637-646.

- [178] L. Givalois, J. Dornand, M. Mekaouche, M.D. Solier, A.F. Bristow, G. Ixart, P. Siaud, I. Assenmacher, G. Barbanel, Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats, *Am J Physiol* 267 (1994) R164-170.
- [179] Y. Gnatek, G. Zimmerman, Y. Goll, N. Najami, H. Soreq, A. Friedman, Acetylcholinesterase loosens the brain's cholinergic anti-inflammatory response and promotes epileptogenesis, *Front Mol Neurosci* 5 (2012) 66.
- [180] L.E. Goehler, J.K. Relton, D. Dripps, R. Kiechle, N. Tartaglia, S.F. Maier, L.R. Watkins, Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication, *Brain Res Bull* 43 (1997) 357-364.
- [181] J.M. Goldbach, J. Roth, E. Zeisberger, Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration, *Am J Physiol* 272 (1997) R675-681.
- [182] D. Goldman, R.M. Bateman, C.G. Ellis, Effect of decreased O₂ supply on skeletal muscle oxygenation and O₂ consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (2006) H2277-2285.
- [183] R. Gorina, R. Lyck, D. Vestweber, B. Engelhardt, beta2 integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier, *J Immunol* 192 (2014) 324-337.
- [184] M.B. Graeber, W.J. Streit, D. Buringer, D.L. Sparks, G.W. Kreutzberg, Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain, *J Neuropathol Exp Neurol* 51 (1992) 303-311.
- [185] R. Green, L.K. Scott, A. Minagar, S. Conrad, Sepsis associated encephalopathy (SAE): a review, *Front Biosci* 9 (2004) 1637-1641.
- [186] J. Greenwood, S.J. Heasman, J.I. Alvarez, A. Prat, R. Lyck, B. Engelhardt, Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain, *Neuropathol Appl Neurobiol* 37 (2011) 24-39.
- [187] R. Gregersen, K. Lambertsen, B. Finsen, Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice, *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (2000) 53-65.
- [188] A.B. Groeneveld, W. Bronsveld, L.G. Thijs, Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock, *Surgery* 99 (1986) 140-153.
- [189] C. Grunfeld, C. Zhao, J. Fuller, A. Pollack, A. Moser, J. Friedman, K.R. Feingold, Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters, *J Clin Invest* 97 (1996) 2152-2157.
- [190] Y.Z. Guan, X.D. Jin, L.X. Guan, H.C. Yan, P. Wang, Z. Gong, S.J. Li, X. Cao, Y.L. Xing, T.M. Gao, Nicotine inhibits microglial proliferation and is neuroprotective in global ischemia rats, *Mol Neurobiol* 51 (2015) 1480-1488.
- [191] E.G. Gutierrez, W.A. Banks, A.J. Kastin, Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse, *J Neuroimmunol* 47 (1993) 169-176.
- [192] M.W. Halterman, C. De Jesus, D.A. Rempe, N.F. Schor, H.J. Federoff, Loss of c/EBP-beta activity promotes the adaptive to apoptotic switch in hypoxic cortical neurons, *Mol Cell Neurosci* 38 (2008) 125-137.

- [193] M.K. Hansen, S. Daniels, L.E. Goehler, R.P. Gaykema, S.F. Maier, L.R. Watkins, Subdiaphragmatic vagotomy does not block intraperitoneal lipopolysaccharide-induced fever, *Auton Neurosci* 85 (2000) 83-87.
- [194] M.K. Hansen, J.M. Krueger, Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep- and fever-promoting effects of interleukin-1beta, *Am J Physiol* 273 (1997) R1246-1253.
- [195] M.K. Hansen, P. Taishi, Z. Chen, J.M. Krueger, Vagotomy blocks the induction of interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1beta, *J Neurosci* 18 (1998) 2247-2253.
- [196] L.M. Harden, I. du Plessis, S. Poole, H.P. Laburn, Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior, *Physiol Behav* 89 (2006) 146-155.
- [197] D. Hartl, S. Krauss-Etschmann, B. Koller, P.L. Hordijk, T.W. Kuijpers, F. Hoffmann, A. Hector, E. Eber, V. Marcos, I. Bittmann, O. Eickelberg, M. Griesse, D. Roos, Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases, *J Immunol* 181 (2008) 8053-8067.
- [198] M. He, Z. Xu, T. Ding, D.M. Kuang, L. Zheng, MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta, *Cell Mol Immunol* 6 (2009) 343-352.
- [199] T. Hehlhans, C. Seitz, C. Lewis, D.N. Mannel, Hypoxic upregulation of TNF receptor type 2 expression involves NF-IL-6 and is independent of HIF-1 or HIF-2, *J Interferon Cytokine Res* 21 (2001) 757-762.
- [200] P.C. Heinrich, I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, L. Graeve, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J* 334 (Pt 2) (1998) 297-314.
- [201] M. Heinzelmann, M.A. Mercer-Jones, J.C. Passmore, Neutrophils and renal failure, *Am J Kidney Dis* 34 (1999) 384-399.
- [202] J.G. Heuer, T. Zhang, J. Zhao, C. Ding, M. Cramer, K.L. Justen, S.L. Vonderfecht, S. Na, Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis, *J Immunol* 174 (2005) 7141-7146.
- [203] S.J. Hewett, T.F. Uliasz, A.S. Vidwans, J.A. Hewett, Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture, *J Pharmacol Exp Ther* 293 (2000) 417-425.
- [204] E.L. Ho, R. Ronquillo, H. Altmeyen, S.S. Spudich, R.W. Price, E. Sinclair, Cellular Composition of Cerebrospinal Fluid in HIV-1 Infected and Uninfected Subjects, *PLoS One* 8 (2013) e66188.
- [205] J.S. Ho, J.P. Buchweitz, R.A. Roth, P.E. Ganey, Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes, *J Leukoc Biol* 59 (1996) 716-724.
- [206] K. Hoehrl, F. Dreher, A. Kurtz, M. Bucher, Cyclooxygenase-2 inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced cardiovascular failure, *Hypertension* 40 (2002) 947-953.
- [207] H. Hofer, Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere., *Zool Anz (Suppl)* 22 (1958) 203-251.
- [208] B.W. Holzapfel, L., Die quantitative realtime-PCR (qRT-PCR), *Biologie in unserer Zeit* 37 (2007) 120-136.

- [209] I.C. Hoogland, C. Houbolt, D.J. van Westerloo, W.A. van Gool, D. van de Beek, Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments, *J Neuroinflammation* 12 (2015) 114.
- [210] N. Horie, K. Hashimoto, T. Kato, T. Shimoyama, T. Kaneko, K. Kusama, H. Sakagami, COX-2 as possible target for the inhibition of PGE2 production by Rikko-san in activated macrophage, *In Vivo* 22 (2008) 333-336.
- [211] Y. Hosoya, M. Matsushita, A direct projection from the hypothalamus to the area postrema in the rat, as demonstrated by the HRP and autoradiographic methods, *Brain Res* 214 (1981) 144-149.
- [212] K.A. Hossmann, Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia, *Ann Neurol* 36 (1994) 557-565.
- [213] R.S. Hotchkiss, K.W. Tinsley, P.E. Swanson, K.C. Chang, J.P. Cobb, T.G. Buchman, S.J. Korsmeyer, I.E. Karl, Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 14541-14546.
- [214] C. Howarth, The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow, *Front Neurosci* 8 (2014) 103.
- [215] C.H. Hsieh, H.Y. Li, J.C. Chen, Nitric oxide and interleukin-1 β mediate noradrenergic induced corticotrophin-releasing hormone release in organotypic cultures of rat paraventricular nucleus, *Neuroscience* 165 (2010) 1191-1202.
- [216] W. Hsu, T.K. Kerppola, P.L. Chen, T. Curran, S. Chen-Kiang, Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region, *Mol Cell Biol* 14 (1994) 268-276.
- [217] D. Huang, Y. Han, M.R. Rani, A. Glabinski, C. Trebst, T. Sorensen, M. Tani, J. Wang, P. Chien, S. O'Bryan, B. Bielecki, Z.L. Zhou, S. Majumder, R.M. Ransohoff, Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation, *Immunol Rev* 177 (2000) 52-67.
- [218] J. Huggett, K. Dheda, S. Bustin, A. Zumla, Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations, *Genes Immun* 6 (2005) 279-284.
- [219] L. Hui, Y. Yao, S. Wang, Y. Yu, N. Dong, H. Li, Z. Sheng, Inhibition of Janus kinase 2 and signal transduction and activator of transcription 3 protect against cecal ligation and puncture-induced multiple organ damage and mortality, *J Trauma* 66 (2009) 859-865.
- [220] J. Huppert, D. Closhen, A. Croxford, R. White, P. Kulig, E. Pietrowski, I. Bechmann, B. Becher, H.J. Luhmann, A. Waisman, C.R. Kuhlmann, Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption, *FASEB J* 24 (2010) 1023-1034.
- [221] J.M. Huston, M. Ochani, M. Rosas-Ballina, H. Liao, K. Ochani, V.A. Pavlov, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ashok, C.J. Czura, B. Foxwell, K.J. Tracey, L. Ulloa, Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis, *J Exp Med* 203 (2006) 1623-1628.
- [222] J.M. Huston, M. Rosas-Ballina, X. Xue, O. Dowling, K. Ochani, M. Ochani, M.M. Yeboah, P.K. Chatterjee, K.J. Tracey, C.N. Metz, Cholinergic neural signals to the spleen down-regulate leukocyte trafficking via CD11b, *J Immunol* 183 (2009) 552-559.

- [223] A.P. Hutchins, D. Diez, D. Miranda-Saavedra, The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges, *Brief Funct Genomics* 12 (2013) 489-498.
- [224] S. Ikejima, S. Sasaki, H. Sashinami, F. Mori, Y. Ogawa, T. Nakamura, Y. Abe, K. Wakabayashi, T. Suda, A. Nakane, Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice, *Diabetes* 54 (2005) 182-189.
- [225] T. Ikezoe, Y. Yang, D. Heber, H. Taguchi, H.P. Koeffler, PC-SPES: a potent inhibitor of nuclear factor-kappa B rescues mice from lipopolysaccharide-induced septic shock, *Mol Pharmacol* 64 (2003) 1521-1529.
- [226] W. Inoue, S. Poole, A.F. Bristow, G.N. Luheshi, Leptin induces cyclooxygenase-2 via an interaction with interleukin-1beta in the rat brain, *Eur J Neurosci* 24 (2006) 2233-2245.
- [227] N. Isailovic, K. Daigo, A. Mantovani, C. Selmi, Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation, *J Autoimmun* 60 (2015) 1-11.
- [228] H. Ito, I. Kanno, M. Ibaraki, J. Hatazawa, S. Miura, Changes in human cerebral blood flow and cerebral blood volume during hypercapnia and hypocapnia measured by positron emission tomography, *J Cereb Blood Flow Metab* 23 (2003) 665-670.
- [229] H.D. Itskovitz, N.A. Terragno, J.C. McGiff, Effect of a renal prostaglandin on distribution of blood flow in the isolated canine kidney, *Circ Res* 34 (1974) 770-776.
- [230] T. Iwai, S. Ito, K. Tanimitsu, S. Udagawa, J. Oka, Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1beta production in cultured rat astrocytes, *Neurosci Res* 55 (2006) 352-360.
- [231] T. Iwai, T. Sawabe, K. Tanimitsu, M. Suzuki, S. Sasaki-Hamada, J. Oka, Glucagon-like peptide-1 protects synaptic and learning functions from neuroinflammation in rodents, *J Neurosci Res* 92 (2014) 446-454.
- [232] T.J. Iwashyna, E.W. Ely, D.M. Smith, K.M. Langa, Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis, *JAMA* 304 (2010) 1787-1794.
- [233] A. Jacob, J.R. Brorson, J.J. Alexander, Septic encephalopathy: inflammation in man and mouse, *Neurochem Int* 58 (2011) 472-476.
- [234] J.K. Jenkins, M. Malyak, W.P. Arend, The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils, *Lymphokine Cytokine Res* 13 (1994) 47-54.
- [235] K.A. Ji, M.Y. Eu, S.H. Kang, B.J. Gwag, I. Jou, E.H. Joe, Differential neutrophil infiltration contributes to regional differences in brain inflammation in the substantia nigra pars compacta and cortex, *Glia* 56 (2008) 1039-1047.
- [236] K.A. Ji, M.S. Yang, H.K. Jeong, K.J. Min, S.H. Kang, I. Jou, E.H. Joe, Resident microglia die and infiltrated neutrophils and monocytes become major inflammatory cells in lipopolysaccharide-injected brain, *Glia* 55 (2007) 1577-1588.
- [237] Y. Jiang, L. Li, B. Liu, Y. Zhang, Q. Chen, C. Li, PPARgamma upregulation induced by vagus nerve stimulation exerts anti-inflammatory effect in cerebral ischemia/reperfusion rats, *Med Sci Monit* 21 (2015) 268-275.
- [238] Y. Jiang, L. Li, B. Liu, Y. Zhang, Q. Chen, C. Li, Vagus nerve stimulation attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury via endogenous cholinergic pathway in rat, *PLoS One* 9 (2014) e102342.

- [239] D.V. Jovanovic, J.A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F.C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, J.P. Pelletier, IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages, *J Immunol* 160 (1998) 3513-3521.
- [240] I.M. Kafa, S. Bakirci, M. Uysal, M.A. Kurt, Alterations in the brain electrical activity in a rat model of sepsis-associated encephalopathy, *Brain Res* 1354 (2010) 217-226.
- [241] M. Kalia, J.M. Sullivan, Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat, *J Comp Neurol* 211 (1982) 248-265.
- [242] N.C. Kaneider, A. Agarwal, A.J. Leger, A. Kuliopulos, Reversing systemic inflammatory response syndrome with chemokine receptor peptidicins, *Nat Med* 11 (2005) 661-665.
- [243] K.N. Kangelaris, A. Prakash, K.D. Liu, B. Aouizerat, P.G. Woodruff, D.J. Erle, A.J. Rogers, E.J. Seeley, J. Chu, T. Liu, T. Osterberg-Deiss, H. Zhuo, M.A. Matthay, C.S. Calfee, Increased Expression Of Neutrophil-Related Genes In Patients With Early Sepsis-Induced ARDS, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2015) ajplung 00380 02014.
- [244] C.Y. Kao, F. Huang, Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, C. Kim, L. Tam, R. Wu, Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway, *J Immunol* 175 (2005) 6676-6685.
- [245] R. Kapadia, K. Tureyen, K.K. Bowen, H. Kalluri, P.F. Johnson, R. Vemuganti, Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia, *J Neurochem* 98 (2006) 1718-1731.
- [246] E.D. Kartal, E. Karkac, Z. Gulbas, S.N. Alpat, N. Erben, E. Colak, Several Cytokines and Protein C Levels with the Apache II Scoring System for Evaluation of Patients with Sepsis, *Balkan Med J* 29 (2012) 174-178.
- [247] A.J. Kastin, V. Akerstrom, W. Pan, Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier, *J Mol Neurosci* 18 (2002) 7-14.
- [248] A. Kawabata, Prostaglandin E2 and pain--an update, *Biol Pharm Bull* 34 (2011) 1170-1173.
- [249] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat Immunol* 11 (2010) 373-384.
- [250] H. Kebir, K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, A. Prat, Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation, *Nat Med* 13 (2007) 1173-1175.
- [251] M. Khalil, J. Ronda, M. Weintraub, K. Jain, R. Silver, A.J. Silverman, Brain mast cell relationship to neurovasculature during development, *Brain Res* 1171 (2007) 18-29.
- [252] K.A. Kigerl, J.C. Gensel, D.P. Ankeny, J.K. Alexander, D.J. Donnelly, P.G. Popovich, Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord, *J Neurosci* 29 (2009) 13435-13444.
- [253] E.J. Kim, K.J. Kwon, J.Y. Park, S.H. Lee, C.H. Moon, E.J. Baik, Neuroprotective effects of prostaglandin E2 or cAMP against microglial and neuronal free radical mediated toxicity associated with inflammation, *J Neurosci Res* 70 (2002) 97-107.

- [254] A. Kimmoun, E. Novy, T. Auchet, N. Ducrocq, B. Levy, Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside, *Crit Care* 19 (2015) 175.
- [255] J. Kipnis, H. Cohen, M. Cardon, Y. Ziv, M. Schwartz, T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 8180-8185.
- [256] T. Kishimoto, Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130, *Stem Cells* 12 Suppl 1 (1994) 37-44; discussion 44-35.
- [257] E. Kiss-Toth, S.M. Bagstaff, H.Y. Sung, V. Jozsa, C. Dempsey, J.C. Caunt, K.M. Oxley, D.H. Wyllie, T. Polgar, M. Harte, A. O'Neill L, E.E. Qwarnstrom, S.K. Dower, Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades, *J Biol Chem* 279 (2004) 42703-42708.
- [258] T. Kisseleva, S. Bhattacharya, J. Braunstein, C.W. Schindler, Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges, *Gene* 285 (2002) 1-24.
- [259] Y. Kita, K. Yoshida, S.M. Tokuoka, F. Hamano, M. Yamazaki, K. Sakimura, M. Kano, T. Shimizu, Fever Is Mediated by Conversion of Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol to Prostaglandin E2, *PLoS One* 10 (2015) e0133663.
- [260] P. Kivisakk, D.J. Mahad, M.K. Callahan, C. Trebst, B. Tucky, T. Wei, L. Wu, E.S. Baekkevold, H. Lassmann, S.M. Staugaitis, J.J. Campbell, R.M. Ransohoff, Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 8389-8394.
- [261] U. Kiesel, H. Wolburg, Tight junctions of the blood-brain barrier, *Cell Mol Neurobiol* 20 (2000) 57-76.
- [262] E. Koc, G. Ustundag, D. Aliefendioglu, E. Ergenekon, A. Bideci, Y. Atalay, Serum leptin levels and their relationship to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in neonatal sepsis, *J Pediatr Endocrinol Metab* 16 (2003) 1283-1287.
- [263] J.P. Konsman, B. Drukarch, A.M. Van Dam, (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology, *Clin Sci (Lond)* 112 (2007) 1-25.
- [264] J.P. Konsman, G.N. Luheshi, R.M. Bluthé, R. Dantzer, The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis, *Eur J Neurosci* 12 (2000) 4434-4446.
- [265] B.S. Kopf, W. Langhans, N. Geary, B. Hrupka, L. Asarian, Evidence that PGE2 in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 99 (2011) 437-443.
- [266] M. Korotkova, P.J. Jakobsson, Microsomal prostaglandin synthase-1 in rheumatic diseases, *Front Pharmacol* 1 (2010) 146.
- [267] E. Kosek, R. Altawil, D. Kadetoff, A. Finn, M. Westman, E. Le Maitre, M. Andersson, M. Jensen-Urstad, J. Lampa, Evidence of different mediators of central inflammation in dysfunctional and inflammatory pain--interleukin-8 in fibromyalgia and interleukin-1 beta in rheumatoid arthritis, *J Neuroimmunol* 280 (2015) 49-55.
- [268] M.A. Kovach, T.J. Standiford, The function of neutrophils in sepsis, *Curr Opin Infect Dis* 25 (2012) 321-327.

- [269] M. Kox, J.C. Pompe, M.C. Gordinou de Gouberville, J.G. van der Hoeven, C.W. Hoedemaekers, P. Pickkers, Effects of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 on the innate immune response in humans, *Shock* 36 (2011) 5-11.
- [270] M. Kox, B.P. Ramakers, J.C. Pompe, J.G. van der Hoeven, C.W. Hoedemaekers, P. Pickkers, Interplay between the acute inflammatory response and heart rate variability in healthy human volunteers, *Shock* 36 (2011) 115-120.
- [271] M. Kox, L.T. van Eijk, T. Verhaak, T. Frenzel, H.D. Kiers, J. Gerretsen, J.G. van der Hoeven, L. Kornet, A. Scheiner, P. Pickkers, Transvenous vagus nerve stimulation does not modulate the innate immune response during experimental human endotoxemia: a randomized controlled study, *Arthritis Res Ther* 17 (2015) 150.
- [272] M. Kox, J.F. van Velzen, J.C. Pompe, C.W. Hoedemaekers, J.G. van der Hoeven, P. Pickkers, GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation, *Biochem Pharmacol* 78 (2009) 863-872.
- [273] D.L. Krebs, D.J. Hilton, SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling, *Stem Cells* 19 (2001) 378-387.
- [274] J.M. Krueger, J.A. Majde, Microbial products and cytokines in sleep and fever regulation, *Crit Rev Immunol* 14 (1994) 355-379.
- [275] J.A. Kruse (Ed.), Blood lactate concentration in sepsis. The sepsis text, Springer, 2002, 323-338 pp.
- [276] M.J. Krzyzaniak, C.Y. Peterson, G. Cheadle, W. Loomis, P. Wolf, V. Kennedy, J.G. Putnam, V. Bansal, B. Eliceiri, A. Baird, R. Coimbra, Efferent vagal nerve stimulation attenuates acute lung injury following burn: The importance of the gut-lung axis, *Surgery* 150 (2011) 379-389.
- [277] P. Kubes, J. Hunter, D.N. Granger, Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment, *Gastroenterology* 103 (1992) 807-812.
- [278] N. Laflamme, S. Rivest, Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain, *J Neurochem* 73 (1999) 309-321.
- [279] Q.L. Lam, L. Lu, Role of leptin in immunity, *Cell Mol Immunol* 4 (2007) 1-13.
- [280] C.H. Lammers, P. Schweitzer, P. Facchinetti, J.M. Arrang, S.G. Madamba, G.R. Siggins, D. Piomelli, Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling, *J Neurochem* 66 (1996) 147-152.
- [281] R. Landmann, A.M. Reber, S. Sansano, W. Zimmerli, Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock, *J Infect Dis* 173 (1996) 661-668.
- [282] A. Lange, D. Gebremedhin, J. Narayanan, D. Harder, 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C, *J Biol Chem* 272 (1997) 27345-27352.
- [283] R.K. Laterra J, Betz LA, Goldstein GW, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.
- [284] M.B. Lawrence, T.A. Springer, Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins, *Cell* 65 (1991) 859-873.

- [285] S. Laye, R.M. Bluthé, S. Kent, C. Combe, C. Medina, P. Parnet, K. Kelley, R. Dantzer, Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS, *Am J Physiol* 268 (1995) R1327-1331.
- [286] S. Laye, P. Parnet, E. Goujon, R. Dantzer, Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice, *Brain Res Mol Brain Res* 27 (1994) 157-162.
- [287] O. Le Bail, R. Schmidt-Ullrich, A. Israel, Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family, *EMBO J* 12 (1993) 5043-5049.
- [288] E. Le Maitre, P. Revathikumar, H. Idborg, J. Raouf, M. Korotkova, P.J. Jakobsson, J. Lampa, Impaired vagus-mediated immunosuppression in microsomal prostaglandin E synthase-1 deficient mice, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2015).
- [289] L. Legroux, N. Arbour, Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story, *J Neuroimmune Pharmacol* (2015).
- [290] L.R. Leon, W. Kozak, K. Rudolph, M.J. Kluger, An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice, *Am J Physiol* 276 (1999) R81-89.
- [291] M. Levi, T. van der Poll, Inflammation and coagulation, *Crit Care Med* 38 (2010) S26-34.
- [292] G. Levy, J.E. Fishman, D.Z. Xu, W. Dong, D. Palange, G. Vida, A. Mohr, L. Ulloa, E.A. Deitch, Vagal nerve stimulation modulates gut injury and lung permeability in trauma-hemorrhagic shock, *J Trauma Acute Care Surg* 73 (2012) 338-342; discussion 342.
- [293] D.Y. Li, P. Hardy, D. Abran, A.K. Martinez-Bermudez, A.M. Guerguerian, M. Bhattacharya, G. Almazan, R. Menezes, K.G. Peri, D.R. Varma, S. Chemtob, Key role for cyclooxygenase-2 in PGE2 and PGF2alpha receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn, *Am J Physiol* 273 (1997) R1283-1290.
- [294] S.C. Liang, X.Y. Tan, D.P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, L.A. Fouser, Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides, *J Exp Med* 203 (2006) 2271-2279.
- [295] W.C. Liles, W.C. Van Voorhis, Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response, *J Infect Dis* 172 (1995) 1573-1580.
- [296] U. Lindauer, D. Megow, H. Matsuda, U. Dirnagl, Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex, *Am J Physiol* 277 (1999) H799-811.
- [297] U. Lindauer, A. Villringer, U. Dirnagl, Characterization of CBF response to somatosensory stimulation: model and influence of anesthetics, *Am J Physiol* 264 (1993) H1223-1228.
- [298] J.A. Lindgren, T. Hokfelt, S.E. Dahlen, C. Patrono, B. Samuelsson, Leukotrienes in the rat central nervous system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984) 6212-6216.
- [299] S.F. Liu, A.B. Malik, NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290 (2006) L622-L645.
- [300] S.F. Liu, X. Ye, A.B. Malik, Pyrrolidine dithiocarbamate prevents I-kappaB degradation and reduces microvascular injury induced by lipopolysaccharide in multiple organs, *Mol Pharmacol* 55 (1999) 658-667.

- [301] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402-408.
- [302] A.L. Loeb, N.R. Raj, D.E. Longnecker, Cerebellar nitric oxide is increased during isoflurane anesthesia compared to halothane anesthesia: a microdialysis study in rats, *Anesthesiology* 89 (1998) 723-730.
- [303] R. Lundblad, J.M. Nesland, K.E. Giercksky, Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats, *Crit Care Med* 24 (1996) 820-826.
- [304] F.W. Luscinskas, S. Ma, A. Nusrat, C.A. Parkos, S.K. Shaw, Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair, *Semin Immunol* 14 (2002) 105-113.
- [305] R. Lyck, N. Ruderisch, A.G. Moll, O. Steiner, C.D. Cohen, B. Engelhardt, V. Makrides, F. Verrey, Culture-induced changes in blood-brain barrier transcriptome: implications for amino-acid transporters in vivo, *J Cereb Blood Flow Metab* 29 (2009) 1491-1502.
- [306] D. Maimone, C. Cioni, S. Rosa, G. Macchia, F. Aloisi, P. Annunziata, Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha, *J Neuroimmunol* 47 (1993) 73-81.
- [307] P. Mancuso, A. Gottschalk, S.M. Phare, M. Peters-Golden, N.W. Lukacs, G.B. Huffnagle, Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia, *J Immunol* 168 (2002) 4018-4024.
- [308] X. Marechal, R. Favory, O. Joulin, D. Montaigne, S. Hassoun, B. Decoster, F. Zerimech, R. Neviere, Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress, *Shock* 29 (2008) 572-576.
- [309] A.L. Marsland, P.J. Gianaros, A.A. Prather, J.R. Jennings, S.A. Neumann, S.B. Manuck, Stimulated production of proinflammatory cytokines covaries inversely with heart rate variability, *Psychosom Med* 69 (2007) 709-716.
- [310] D. Martelli, M.J. McKinley, R.M. McAllen, The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review, *Auton Neurosci* 182 (2014) 65-69.
- [311] T.L. Martin, E.J. Mufson, M.M. Mesulam, The light side of horseradish peroxidase histochemistry, *J Histochem Cytochem* 32 (1984) 793.
- [312] C.A. Mastronardi, W.H. Yu, V.K. Srivastava, W.L. Dees, S.M. McCann, Lipopolysaccharide-induced leptin release is neurally controlled, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 14720-14725.
- [313] G. Matarese, A. Di Giacomo, V. Sanna, G.M. Lord, J.K. Howard, A. Di Tuoro, S.R. Bloom, R.I. Lechler, S. Zappacosta, S. Fontana, Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 166 (2001) 5909-5916.
- [314] N. Matsuda, Y. Hattori, Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction, *J Smooth Muscle Res* 43 (2007) 117-137.
- [315] T. Matsuura, I. Kanno, Quantitative and temporal relationship between local cerebral blood flow and neuronal activation induced by somatosensory stimulation in rats, *Neurosci Res* 40 (2001) 281-290.
- [316] B.W. McColl, N.J. Rothwell, S.M. Allan, Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain

- damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms, *J Neurosci* 27 (2007) 4403-4412.
- [317] S.R. McColl, M.A. Staykova, A. Wozniak, S. Fordham, J. Bruce, D.O. Willenborg, Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 161 (1998) 6421-6426.
 - [318] L. McCullough, L. Wu, N. Haughey, X. Liang, T. Hand, Q. Wang, R.M. Breyer, K. Andreasson, Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia, *J Neurosci* 24 (2004) 257-268.
 - [319] H.M. McGettrick, J.M. Lord, K.Q. Wang, G.E. Rainger, C.D. Buckley, G.B. Nash, Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium, *J Leukoc Biol* 79 (2006) 779-788.
 - [320] C.S. McKimmie, G.J. Graham, Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner, *Biochem Biophys Res Commun* 394 (2010) 1006-1011.
 - [321] S.L. McKnight, M.D. Lane, S. Gluecksohn-Waelsch, Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism?, *Genes Dev* 3 (1989) 2021-2024.
 - [322] J.J. Meier, M.A. Nauck, Glucagon-like peptide 1(GLP-1) in biology and pathology, *Diabetes Metab Res Rev* 21 (2005) 91-117.
 - [323] I. Merchenthaler, M. Lane, P. Shughrue, Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system, *J Comp Neurol* 403 (1999) 261-280.
 - [324] O. Micheau, J. Tschoop, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes, *Cell* 114 (2003) 181-190.
 - [325] S. Mihaylova, A. Killian, K. Mayer, S.S. Pullamsetti, R. Schermuly, B. Rosengarten, Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxemic rats, *J Neuroinflammation* 9 (2012) 183.
 - [326] S. Mihaylova, H. Schweighofer, H. Hackstein, B. Rosengarten, Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation in endotoxemic rats on blood and spleen lymphocyte subsets, *Inflamm Res* 63 (2014) 683-690.
 - [327] J.P. Mira, A. Cariou, F. Grall, C. Delclaux, M.R. Losser, F. Heshmati, C. Cheval, M. Monchi, J.L. Teboul, F. Riche, G. Leleu, L. Arbibe, A. Mignon, M. Delpech, J.F. Dhainaut, Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study, *JAMA* 282 (1999) 561-568.
 - [328] V. Mollace, M. Colasanti, C. Muscoli, G.M. Lauro, M. Iannone, D. Rotiroti, G. Nistico, The effect of nitric oxide on cytokine-induced release of PGE2 by human cultured astroglial cells, *Br J Pharmacol* 124 (1998) 742-746.
 - [329] Z. Molnar, E. Shearer, D. Lowe, N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study, *Crit Care Med* 27 (1999) 1100-1104.
 - [330] F. Montecucco, G. Bianchi, P. Gnerre, M. Bertolotto, F. Dallegrì, L. Ottonello, Induction of neutrophil chemotaxis by leptin: crucial role for p38 and Src kinases, *Ann N Y Acad Sci* 1069 (2006) 463-471.

- [331] S.I. Moore, G.B. Huffnagle, G.H. Chen, E.S. White, P. Mancuso, Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*, *Infect Immun* 71 (2003) 4182-4185.
- [332] D.K. Morest, Experimental study of the projections of the nucleus of the tractus solitarius and the area postrema in the cat, *J Comp Neurol* 130 (1967) 277-300.
- [333] C. Mülhardt (Ed.), *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.
- [334] W.A. Muller, Getting leukocytes to the site of inflammation, *Vet Pathol* 50 (2013) 7-22.
- [335] S.J. Mulligan, B.A. MacVicar, Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions, *Nature* 431 (2004) 195-199.
- [336] K.B. Mullis, F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* 155 (1987) 335-350.
- [337] B.C. Munster, E. Aronica, A.H. Zwinderman, P. Eikelenboom, C. Cunningham, S.E. Rooij, Neuroinflammation in delirium: a postmortem case-control study, *Rejuvenation Res* 14 (2011) 615-622.
- [338] V. Muoio, P.B. Persson, M.M. Sendeski, The neurovascular unit - concept review, *Acta Physiol (Oxf)* 210 (2014) 790-798.
- [339] J. Mutze, J. Roth, R. Gerstberger, K. Matsumura, T. Hubschle, Immunohistochemical evidence of functional leptin receptor expression in neuronal and endothelial cells of the rat brain, *Neurosci Lett* 394 (2006) 105-110.
- [340] S. Nadeau, P. Hein, K.J. Fernandes, A.C. Peterson, F.D. Miller, A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury, *Mol Cell Neurosci* 29 (2005) 525-535.
- [341] T.A. Nakada, J.A. Russell, J.H. Boyd, K.R. Walley, IL17A genetic variation is associated with altered susceptibility to Gram-positive infection and mortality of severe sepsis, *Crit Care* 15 (2011) R254.
- [342] D.M. Nance, V.M. Sanders, Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007), *Brain Behav Immun* 21 (2007) 736-745.
- [343] J. Napetschnig, H. Wu, Molecular basis of NF-kappaB signaling, *Annu Rev Biophys* 42 (2013) 443-468.
- [344] P.P. Nawroth, D.M. Stern, Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor, *J Exp Med* 163 (1986) 740-745.
- [345] T.L. Ness, C.M. Hogaboam, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, Immunomodulatory role of CXCR2 during experimental septic peritonitis, *J Immunol* 171 (2003) 3775-3784.
- [346] E.A. Neuwelt, B. Bauer, C. Fahlke, G. Fricker, C. Iadecola, D. Janigro, L. Leybaert, Z. Molnar, M.E. O'Donnell, J.T. Povlishock, N.R. Saunders, F. Sharp, D. Stanimirovic, R.J. Watts, L.R. Drewes, Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology, *Nat Rev Neurosci* 12 (2011) 169-182.
- [347] A.C. Ngai, J.R. Meno, H.R. Winn, Simultaneous measurements of pial arteriolar diameter and laser-Doppler flow during somatosensory stimulation, *J Cereb Blood Flow Metab* 15 (1995) 124-127.

- [348] H.X. Nguyen, T.J. O'Barr, A.J. Anderson, Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF-alpha, *J Neurochem* 102 (2007) 900-912.
- [349] B. Nico, D. Ribatti, Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier, *Curr Drug Metab* 13 (2012) 50-60.
- [350] E.M. Nicolussi, S. Huck, H. Lassmann, M. Bradl, The cholinergic anti-inflammatory system limits T cell infiltration into the neurodegenerative CNS, but cannot counteract complex CNS inflammation, *Neurobiol Dis* 35 (2009) 24-31.
- [351] A. Nijima, The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatportal system in the anesthetized rat, *J Auton Nerv Syst* 61 (1996) 287-291.
- [352] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, F. Helmchen, Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo, *Science* 308 (2005) 1314-1318.
- [353] E. Nizri, M. Irony-Tur-Sinai, O. Lory, A. Orr-Urtreger, E. Lavi, T. Brenner, Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses, *J Immunol* 183 (2009) 6681-6688.
- [354] I. Noll, Diagnose der bakteriellen Sepsis des bovinen Neonaten durch Amplifizierung bakterieller 16S-ribosomaler DNA mittels Polymerasekettenreaktion, IV, III, 143 S. pp.
- [355] S. Nourshargh, R. Alon, Leukocyte migration into inflamed tissues, *Immunity* 41 (2014) 694-707.
- [356] S. Nourshargh, F.M. Marelli-Berg, Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function, *Trends Immunol* 26 (2005) 157-165.
- [357] M. Ogiku, H. Kono, M. Hara, M. Tsuchiya, H. Fujii, Interleukin-17A plays a pivotal role in polymicrobial sepsis according to studies using IL-17A knockout mice, *J Surg Res* 174 (2012) 142-149.
- [358] H. Ohnesorge, P. Bischoff, J. Scholz, E. Yekebas, J. Schulte am Esch, Somatosensory evoked potentials as predictor of systemic inflammatory response syndrome in pigs?, *Intensive Care Med* 29 (2003) 801-807.
- [359] S. Ohtsuki, T. Terasaki, Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development, *Pharm Res* 24 (2007) 1745-1758.
- [360] T. Oka, Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors, *Front Biosci* 9 (2004) 3046-3057.
- [361] F.J. Oliver, J. Menissier-de Murcia, C. Nacci, P. Decker, R. Andriantsitohaina, S. Muller, G. de la Rubia, J.C. Stoclet, G. de Murcia, Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice, *EMBO J* 18 (1999) 4446-4454.
- [362] P.S. Olofsson, M. Rosas-Ballina, Y.A. Levine, K.J. Tracey, Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity, *Immunol Rev* 248 (2012) 188-204.
- [363] J.K. Olson, S.D. Miller, Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs, *J Immunol* 173 (2004) 3916-3924.

- [364] S.M. Opal, C.J. Fisher, Jr., J.F. Dhainaut, J.L. Vincent, R. Brase, S.F. Lowry, J.C. Sadoff, G.J. Slotman, H. Levy, R.A. Balk, M.P. Shelly, J.P. Pribble, J.F. LaBrecque, J. Lookabaugh, H. Donovan, H. Dubin, R. Baughman, J. Norman, E. DeMaria, K. Matzel, E. Abraham, M. Seneff, Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group, *Crit Care Med* 25 (1997) 1115-1124.
- [365] H.L. Pahl, Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene* 18 (1999) 6853-6866.
- [366] M.C. Papadopoulos, F.J. Lamb, R.F. Moss, D.C. Davies, D. Tighe, E.D. Bennett, Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex, *Clin Sci (Lond)* 96 (1999) 461-466.
- [367] E. Parada, J. Egea, I. Buendia, P. Negredo, A.C. Cunha, S. Cardoso, M.P. Soares, M.G. Lopez, The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2, *Antioxid Redox Signal* 19 (2013) 1135-1148.
- [368] H.J. Park, P.H. Lee, Y.W. Ahn, Y.J. Choi, G. Lee, D.Y. Lee, E.S. Chung, B.K. Jin, Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action, *Eur J Neurosci* 26 (2007) 79-89.
- [369] W.C. Paxinos G (Ed.), *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press, San Diego, 1998.
- [370] J.B. Payne, G.K. Johnson, R.A. Reinhardt, J.K. Dyer, C.A. Maze, D.G. Dunning, Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes, *J Periodontal Res* 31 (1996) 99-104.
- [371] G. Paz-Filho, C. Mastronardi, C.B. Franco, K.B. Wang, M.L. Wong, J. Licinio, Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications, *Arq Bras Endocrinol Metabol* 56 (2012) 597-607.
- [372] G. Pena, B. Cai, J. Liu, E.P. van der Zanden, E.A. Deitch, W.J. de Jonge, L. Ulloa, Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis, *Eur J Immunol* 40 (2010) 2580-2589.
- [373] M. Perl, C.S. Chung, U. Perl, W.L. Biffl, W.G. Cioffi, A. Ayala, Beneficial versus detrimental effects of neutrophils are determined by the nature of the insult, *J Am Coll Surg* 204 (2007) 840-852; discussion 852-843.
- [374] M.W. Pfaffl, Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung., *BIOSpektrum Sonderausgabe PCR*, 10 (2004) 92-95.
- [375] K. Pfeffer, T. Matsuyama, T.M. Kundig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P.S. Ohashi, M. Kronke, T.W. Mak, Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection, *Cell* 73 (1993) 457-467.
- [376] R.M. Pope, A. Leutz, S.A. Ness, C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene, *J Clin Invest* 94 (1994) 1449-1455.
- [377] J. Pravda, Metabolic theory of septic shock, *World J Crit Care Med* 3 (2014) 45-54.
- [378] M.G. Proescholdt, S. Chakravarty, J.A. Foster, S.B. Foti, E.M. Briley, M. Herkenham, Intracerebroventricular but not intravenous interleukin-1beta induces widespread vascular-

- mediated leukocyte infiltration and immune signal mRNA expression followed by brain-wide glial activation, *Neuroscience* 112 (2002) 731-749.
- [379] N.C. Qiu, M.E. Liu, B. Wang, X. Song, Y. Jiang, J. Wang, Z.Q. Gu, C.X. Shan, M. Qiu, Does the hepatic branch of vagus mediate the secretion of glucagon-like peptide-1 during the Roux-en-Y gastric bypass surgery?, *J Gastrointest Surg* 18 (2014) 1957-1964.
 - [380] N.C. Qiu, Q. Zhang, X. Song, M.E. Liu, X.K. Li, C.X. Shan, M. Qiu, Impact of the hepatic branch of the vagus and Roux-en-Y gastric bypass on the hypoglycemic effect and glucagon-like peptide-1 in rats with type 2 diabetes mellitus, *J Surg Res* 191 (2014) 123-129.
 - [381] N. Quan, W.A. Banks, Brain-immune communication pathways, *Brain Behav Immun* 21 (2007) 727-735.
 - [382] N. Quan, L. He, W. Lai, T. Shen, M. Herkenham, Induction of IkappaBalpha mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling, *J Neurosci* 20 (2000) 6473-6477.
 - [383] N. Quan, E.L. Stern, M.B. Whiteside, M. Herkenham, Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat, *J Neuroimmunol* 93 (1999) 72-80.
 - [384] N. Quan, M. Whiteside, M. Herkenham, Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide, *Neuroscience* 83 (1998) 281-293.
 - [385] S.T. Qureshi, L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J. Moore, P. Gros, D. Malo, Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4), *J Exp Med* 189 (1999) 615-625.
 - [386] D.P. Ramji, P. Foka, CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem J* 365 (2002) 561-575.
 - [387] E.H. Rannikko, S.S. Weber, P.J. Kahle, Exogenous alpha-synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes, *BMC Neurosci* 16 (2015) 57.
 - [388] R.M. Ransohoff, M.A. Brown, Innate immunity in the central nervous system, *J Clin Invest* 122 (2012) 1164-1171.
 - [389] R.M. Ransohoff, B. Engelhardt, The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system, *Nat Rev Immunol* 12 (2012) 623-635.
 - [390] K. Reinhart, F.M. Brunkhorst, 1. Revision der S 2k Leitlinie: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis; Methodenreport im Auftrag der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e. V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI), (2010).
 - [391] K. Reinhart, F.M. Brunkhorst, H.G. Bone, J. Bardutzky, C.E. Dempfle, H. Forst, P. Gastmeier, H. Gerlach, M. Grundling, S. John, W. Kern, G. Kreymann, W. Kruger, P. Kujath, G. Marggraf, J. Martin, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, M. Oppert, C. Putensen, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, H. Seifert, C. Spies, F. Stuber, N. Weiler, A. Weimann, K. Werdan, T. Welte, [Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI)], *Anaesthesist* 59 (2010) 347-370.

- [392] Y. Reiss, G. Hoch, U. Deutsch, B. Engelhardt, T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells, *Eur J Immunol* 28 (1998) 3086-3099.
- [393] D.G. Remick, G.R. Bolgos, J. Siddiqui, J. Shin, J.A. Nemzek, Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days, *Shock* 17 (2002) 463-467.
- [394] S. Rivest, Molecular insights on the cerebral innate immune system, *Brain Behav Immun* 17 (2003) 13-19.
- [395] A.S. Rocca, P.L. Brubaker, Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion, *Endocrinology* 140 (1999) 1687-1694.
- [396] K.D. Rochfort, P.M. Cummins, Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium, *Microvasc Res* 100 (2015) 48-53.
- [397] H. Rogausch, D. Zwingmann, M. Trudewind, A. del Rey, K.H. Voigt, H. Besedovsky, Local and systemic autonomic nervous effects on cell migration to the spleen, *J Appl Physiol* (1985) 94 (2003) 469-475.
- [398] A.A. Romanovsky, C.T. Simons, M. Szekely, V.A. Kulchitsky, The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation, *Am J Physiol* 273 (1997) R407-413.
- [399] A.J. Rongione, A.M. Kusske, S.W. Ashley, H.A. Reber, D.W. McFadden, Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis, *J Surg Res* 70 (1997) 107-112.
- [400] R.K. Root, R.F. Lodato, W. Patrick, J.F. Cade, N. Fotheringham, S. Milwee, J.L. Vincent, A. Torres, J. Rello, S. Nelson, Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis, *Crit Care Med* 31 (2003) 367-373.
- [401] M. Rosas-Ballina, M. Ochani, W.R. Parrish, K. Ochani, Y.T. Harris, J.M. Huston, S. Chavan, K.J. Tracey, Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 11008-11013.
- [402] M. Rosas-Ballina, P.S. Olofsson, M. Ochani, S.I. Valdes-Ferrer, Y.A. Levine, C. Reardon, M.W. Tusche, V.A. Pavlov, U. Andersson, S. Chavan, T.W. Mak, K.J. Tracey, Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit, *Science* 334 (2011) 98-101.
- [403] W.I. Rosenblum, Constricting effect of leukotrienes on cerebral arterioles of mice, *Stroke* 16 (1985) 262-263.
- [404] B. Rosengarten, M. Hecht, D. Auch, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, F. Grimminger, M. Kaps, Microcirculatory dysfunction in the brain precedes changes in evoked potentials in endotoxin-induced sepsis syndrome in rats, *Cerebrovasc Dis* 23 (2007) 140-147.
- [405] B. Rosengarten, H. Lutz, K.A. Hossmann, A control system approach for evaluating somatosensory activation by laser-Doppler flowmetry in the rat cortex, *J Neurosci Methods* 130 (2003) 75-81.
- [406] B. Rosengarten, M. Walberer, J. Allendoerfer, C. Mueller, N. Schwarz, G. Bachmann, T. Gerriets, LPS-induced endotoxic shock does not cause early brain edema formation - an MRI study in rats, *Inflamm Res* 57 (2008) 479-483.

- [407] B. Rosengarten, S. Wolff, S. Klatt, R.T. Schermuly, Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition or norepinephrine on the neurovascular coupling in an endotoxic rat shock model, *Crit Care* 13 (2009) R139.
- [408] G. Ross, J. Roth, B. Storr, K. Voigt, E. Zeisberger, Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs, *Physiol Behav* 71 (2000) 305-313.
- [409] P. Rossi, A. Ricci, R. De Paulis, E. Papi, H. Pavaci, D. Porcelli, G. Monari, D. Maselli, A. Bellisario, F. Turani, S. Nardella, P. Azzolini, G. Piccirillo, R. Quaglione, S. Valsecchi, S. Bianchi, Epicardial ganglionated plexus stimulation decreases postoperative inflammatory response in humans, *Heart Rhythm* 9 (2012) 943-950.
- [410] J. Roth, C.M. Blatteis, Mechanisms of Fever production and lysis: lessons from experimental LPS Fever, *Compr Physiol* 4 (2014) 1563-1604.
- [411] J. Roth, G.E. De Souza, Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation, *Braz J Med Biol Res* 34 (2001) 301-314.
- [412] J. Roth, E.M. Harre, C. Rummel, R. Gerstberger, T. Hubschle, Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs, *Front Biosci* 9 (2004) 290-300.
- [413] J. Roth, C. Rummel, S.W. Barth, R. Gerstberger, T. Hubschle, Molecular aspects of fever and hyperthermia, *Immunol Allergy Clin North Am* 29 (2009) 229-245.
- [414] C.S. Roy, C.S. Sherrington, On the Regulation of the Blood-supply of the Brain, *J Physiol* 11 (1890) 85-158 117.
- [415] M. Roy, J.F. Richard, A. Dumas, L. Vallieres, CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis, *J Neuroinflammation* 9 (2012) 18.
- [416] J.M. Rumble, A.K. Huber, G. Krishnamoorthy, A. Srinivasan, D.A. Giles, X. Zhang, L. Wang, B.M. Segal, Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS, *J Exp Med* 212 (2015) 23-35.
- [417] C. Rummel, W. Inoue, S. Poole, G.N. Luheshi, Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation, *Mol Psychiatry* 15 (2010) 523-534.
- [418] C. Rummel, W. Inoue, C. Sachot, S. Poole, T. Hubschle, G.N. Luheshi, Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice, *J Comp Neurol* 511 (2008) 373-395.
- [419] C. Rummel, K. Matsumura, G.N. Luheshi, Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain, *Brain Res Bull* 86 (2011) 319-325.
- [420] H. Rupp, B. Person, A. Robert, W. Domschke, Gastric cytoprotection in man by prostaglandin E2, *Scand J Gastroenterol* 16 (1981) 647-652.
- [421] P. Rutecki, Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation, *Epilepsia* 31 Suppl 2 (1990) S1-6.
- [422] J.K. Ryu, K.C. Tran, J.G. McLarnon, Depletion of neutrophils reduces neuronal degeneration and inflammatory responses induced by quinolinic acid in vivo, *Glia* 55 (2007) 439-451.
- [423] C. Sachot, S. Poole, G.N. Luheshi, Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats, *J Physiol* 561 (2004) 263-272.

- [424] C. Sadis, S. Detienne, B. Vokaer, L.M. Charbonnier, P. Lemaitre, C. Spilleboudt, S. Delbaue, C. Kubjak, V. Flamand, K.A. Field, M. Goldman, F.S. Benghiat, A. Le Moine, The cholinergic anti-inflammatory pathway delays TLR-induced skin allograft rejection in mice: cholinergic pathway modulates alloreactivity, *PLoS One* 8 (2013) e79984.
- [425] C. Sadis, G. Teske, G. Stokman, C. Kubjak, N. Claessen, F. Moore, P. Loi, B. Diallo, L. Barvais, M. Goldman, S. Florquin, A. Le Moine, Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway, *PLoS One* 2 (2007) e469.
- [426] R.W. Saeed, S. Varma, T. Peng-Nemeroff, B. Sherry, D. Balakhaneh, J. Huston, K.J. Tracey, Y. Al-Abed, C.N. Metz, Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation, *J Exp Med* 201 (2005) 1113-1123.
- [427] Y. Sakr, M.J. Dubois, D. De Backer, J. Creteur, J.L. Vincent, Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock, *Crit Care Med* 32 (2004) 1825-1831.
- [428] S. Sanduja, F.F. Blanco, L.E. Young, V. Kaza, D.A. Dixon, The role of tristetraprolin in cancer and inflammation, *Front Biosci (Landmark Ed)* 17 (2012) 174-188.
- [429] P. Sarraf, R.C. Frederich, E.M. Turner, G. Ma, N.T. Jaskowiak, D.J. Rivet, 3rd, J.S. Flier, B.B. Lowell, D.L. Fraker, H.R. Alexander, Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia, *J Exp Med* 185 (1997) 171-175.
- [430] P.E. Sawchenko, L.W. Swanson, The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat, *Brain Res* 257 (1982) 275-325.
- [431] P. Scapini, J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, M.A. Cassatella, The neutrophil as a cellular source of chemokines, *Immunol Rev* 177 (2000) 195-203.
- [432] R.J. Schott, J.E. Natale, S.W. Ressler, R.E. Burney, L.G. D'Alecy, Neutrophil depletion fails to improve neurologic outcome after cardiac arrest in dogs, *Ann Emerg Med* 18 (1989) 517-522.
- [433] M. Schulz, B. Engelhardt, The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Cerebrospinal Fluid Res* 2 (2005) 8.
- [434] L. Schurer, B. Groggaard, B. Gerdin, O. Kempfski, K.E. Arfors, Leucocyte depletion does not affect post-ischaemic nerve cell damage in the rat, *Acta Neurochir (Wien)* 111 (1991) 54-60.
- [435] H.P. Schuster, Müller-Werdan, U. (Ed.), Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. Sepsis and MODS, Springer Verlag, Heidelberg, 2005.
- [436] H. Schweighöfer, C. Rummel, K. Mayer, B. Rosengarten, Brain function in iNOS knock out or iNOS inhibited (l-NIL) mice under endotoxic shock, *Intensive Care Medicine Experimental* 2 (2014).
- [437] P.O. Scumpia, M.J. Delano, K.M. Kelly-Scumpia, J.S. Weinstein, J.L. Wynn, R.D. Winfield, C. Xia, C.S. Chung, A. Ayala, M.A. Atkinson, W.H. Reeves, M.J. Clare-Salzler, L.L. Moldawer, Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis, *Blood* 110 (2007) 3673-3681.
- [438] H.-H. Sedlacek, Immunologie - die Immunabwehr des Menschen Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten. De Gruyter, Berlin { u.a., 2014, pp. XV, 789 S.

- [439] R. Sedlakova, R.R. Shivers, R.F. Del Maestro, Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit, *J Submicrosc Cytol Pathol* 31 (1999) 149-161.
- [440] A. Semmler, C.N. Widmann, T. Okulla, H. Urbach, M. Kaiser, G. Widman, F. Mormann, J. Weide, K. Fliessbach, A. Hoeft, F. Jessen, C. Putensen, M.T. Heneka, Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84 (2013) 62-69.
- [441] J. Serrats, J.C. Schiltz, B. Garcia-Bueno, N. van Rooijen, T.M. Reyes, P.E. Sawchenko, Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling, *Neuron* 65 (2010) 94-106.
- [442] A.G. Shabgah, E. Fattahi, F.Z. Shahneh, Interleukin-17 in human inflammatory diseases, *Postepy Dermatol Alergol* 31 (2014) 256-261.
- [443] T. Sharshar, R. Carlier, F. Bernard, C. Guidoux, J.P. Brouland, O. Nardi, G.L. de la Grandmaison, J. Aboab, F. Gray, D. Menon, D. Annane, Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study, *Intensive Care Med* 33 (2007) 798-806.
- [444] T. Sharshar, A. Polito, A. Checinski, R.D. Stevens, Septic-associated encephalopathy--everything starts at a microlevel, *Crit Care* 14 (2010) 199.
- [445] M. Sheehan, H.R. Wong, P.W. Hake, B. Zingarelli, Parthenolide improves systemic hemodynamics and decreases tissue leukosequestration in rats with polymicrobial sepsis, *Crit Care Med* 31 (2003) 2263-2270.
- [446] K. Shibata, H. Yamada, H. Hara, K. Kishihara, Y. Yoshikai, Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production, *J Immunol* 178 (2007) 4466-4472.
- [447] M. Shibata, C.M. Blatteis, Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis, *Brain Res* 562 (1991) 323-326.
- [448] T. Shichita, M. Ito, A. Yoshimura, Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection, *Front Cell Neurosci* 8 (2014) 319.
- [449] A. Shimakura, Y. Kamanaka, Y. Ikeda, K. Kondo, Y. Suzuki, K. Umemura, Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion, *Brain Res* 858 (2000) 55-60.
- [450] J.A. Shukaliak, K. Dorovini-Zis, Expression of the beta-chemokines RANTES and MIP-1 beta by human brain microvessel endothelial cells in primary culture, *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (2000) 339-352.
- [451] R.D. Shytle, T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A.A. Silver, P.R. Sanberg, J. Tan, Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors, *J Neurochem* 89 (2004) 337-343.
- [452] U. Siebenlist, G. Franzoso, K. Brown, Structure, regulation and function of NF-kappa B, *Annu Rev Cell Biol* 10 (1994) 405-455.
- [453] S. Siso, M. Jeffrey, L. Gonzalez, Sensory circumventricular organs in health and disease, *Acta Neuropathol* 120 (2010) 689-705.
- [454] K.P. Skibicka, The central GLP-1: implications for food and drug reward, *Front Neurosci* 7 (2013) 181.

- [455] A.T. Skoutelis, V. Kaleridis, G.M. Athanassiou, K.I. Kokkinis, Y.F. Missirlis, H.P. Bassaris, Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome, *Crit Care Med* 28 (2000) 2355-2359.
- [456] J.E. Sligh, Jr., C.M. Ballantyne, S.S. Rich, H.K. Hawkins, C.W. Smith, A. Bradley, A.L. Beaudet, Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 8529-8533.
- [457] R.P. Sloan, H. McCreath, K.J. Tracey, S. Sidney, K. Liu, T. Seeman, RR interval variability is inversely related to inflammatory markers: the CARDIA study, *Mol Med* 13 (2007) 178-184.
- [458] J.A. Smith, Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword, *J Leukoc Biol* 56 (1994) 672-686.
- [459] J. Sobocki, G. Fourtanier, J. Estany, P. Otal, Does vagal nerve stimulation affect body composition and metabolism? Experimental study of a new potential technique in bariatric surgery, *Surgery* 139 (2006) 209-216.
- [460] V. Solmaz, B.P. Cinar, G. Yigitturk, T. Cavusoglu, D. Taskiran, O. Erbas, Exenatide reduces TNF-alpha expression and improves hippocampal neuron numbers and memory in streptozotocin treated rats, *Eur J Pharmacol* 765 (2015) 482-487.
- [461] F. Sonogo, J.C. Alves-Filho, F.Q. Cunha, Targeting neutrophils in sepsis, *Expert Rev Clin Immunol* 10 (2014) 1019-1028.
- [462] X.M. Song, J.G. Li, Y.L. Wang, Z.F. Hu, Q. Zhou, Z.H. Du, B.H. Jia, The protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against septic shock in rats, *Shock* 30 (2008) 468-472.
- [463] R. Sonnevile, F. Verdonk, C. Rauturier, I.F. Klein, M. Wolff, D. Annane, F. Chretien, T. Sharshar, Understanding brain dysfunction in sepsis, *Ann Intensive Care* 3 (2013) 15.
- [464] S.G. Soriano, S.A. Lipton, Y.F. Wang, M. Xiao, T.A. Springer, J.C. Gutierrez-Ramos, P.R. Hickey, Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury, *Ann Neurol* 39 (1996) 618-624.
- [465] S.J. Spencer, A. Mouihate, M.A. Galic, S.L. Ellis, Q.J. Pittman, Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293 (2007) R581-589.
- [466] T.A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* 76 (1994) 301-314.
- [467] C.L. Sprung, D. Annane, D. Keh, R. Moreno, M. Singer, K. Freivogel, Y.G. Weiss, J. Benbenishty, A. Kalenka, H. Forst, P.F. Laterre, K. Reinhart, B.H. Cuthbertson, D. Payen, J. Briegel, Hydrocortisone therapy for patients with septic shock, *N Engl J Med* 358 (2008) 111-124.
- [468] C.L. Sprung, P.N. Peduzzi, C.H. Shatney, R.M. Schein, M.F. Wilson, J.N. Sheagren, L.B. Hinshaw, Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group, *Crit Care Med* 18 (1990) 801-806.
- [469] D.B. Stanimirovic, J. Wong, A. Shapiro, J.P. Durkin, Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults, *Acta Neurochir Suppl* 70 (1997) 12-16.

- [470] R. Starr, T.A. Willson, E.M. Viney, L.J. Murray, J.R. Rayner, B.J. Jenkins, T.J. Gonda, W.S. Alexander, D. Metcalf, N.A. Nicola, D.J. Hilton, A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling, *Nature* 387 (1997) 917-921.
- [471] B.J. Steffen, G. Breier, E.C. Butcher, M. Schulz, B. Engelhardt, ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro, *Am J Pathol* 148 (1996) 1819-1838.
- [472] M.D. Stern, In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering, *Nature* 254 (1975) 56-58.
- [473] E. Sterneck, P.F. Johnson, CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling, *J Neurochem* 70 (1998) 2424-2433.
- [474] M. Straccia, G. Dentesano, T. Valente, M. Pulido-Salgado, C. Sola, J. Saura, CCAAT/enhancer binding protein beta regulates prostaglandin E synthase expression and prostaglandin E2 production in activated microglial cells, *Glia* 61 (2013) 1607-1619.
- [475] E.L. Streck, C.M. Comim, T. Barichello, J. Quevedo, The septic brain, *Neurochem Res* 33 (2008) 2171-2177.
- [476] R. Strohmeyer, J. Shelton, C. Loughheed, T. Breitkopf, CCAAT-enhancer binding protein-beta expression and elevation in Alzheimer's disease and microglial cell cultures, *PLoS One* 9 (2014) e86617.
- [477] V. Stuckenholz, M. Bacher, M. Balzer-Geldsetzer, D. Alvarez-Fischer, W.H. Oertel, R.C. Dodel, C. Noelker, The alpha7 nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice, *J Parkinsons Dis* 3 (2013) 161-172.
- [478] N. Sugano, K. Shimada, K. Ito, S. Murai, Nicotine inhibits the production of inflammatory mediators in U937 cells through modulation of nuclear factor-kappaB activation, *Biochem Biophys Res Commun* 252 (1998) 25-28.
- [479] P. Sun, K. Zhou, S. Wang, P. Li, S. Chen, G. Lin, Y. Zhao, T. Wang, Involvement of MAPK/NF-kappaB signaling in the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway in experimental colitis by chronic vagus nerve stimulation, *PLoS One* 8 (2013) e69424.
- [480] W. Sun, S.H. Choi, S.K. Park, S.J. Kim, M.R. Noh, E.H. Kim, H.J. Kim, H. Kim, Identification and characterization of novel activity-dependent transcription factors in rat cortical neurons, *J Neurochem* 100 (2007) 269-278.
- [481] Y. Sun, Q. Li, H. Gui, D.P. Xu, Y.L. Yang, D.F. Su, X. Liu, MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, *Cell Res* 23 (2013) 1270-1283.
- [482] P.M. Suter, Xigris is withdrawn from the market. A 10 year odyssey, *Minerva Anestesiol* 77 (2011) 1128-1129.
- [483] A. Svenningsson, O. Andersen, M. Edsbacke, S. Stemme, Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid, *J Neuroimmunol* 63 (1995) 39-46.
- [484] F.S. Taccone, S. Scolletta, F. Franchi, K. Donadello, M. Oddo, Brain perfusion in sepsis, *Curr Vasc Pharmacol* 11 (2013) 170-186.
- [485] F.S. Taccone, F. Su, C. De Deyne, A. Abdellhai, C. Pierrakos, X. He, K. Donadello, O. Dewitte, J.L. Vincent, D. De Backer, Sepsis is associated with altered cerebral

- microcirculation and tissue hypoxia in experimental peritonitis, *Crit Care Med* 42 (2014) e114-122.
- [486] F.S. Taccone, F. Su, C. Pierrakos, X. He, S. James, O. Dewitte, J.L. Vincent, D. De Backer, Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study, *Crit Care* 14 (2010) R140.
 - [487] T. Takadera, H. Yumoto, Y. Tozuka, T. Ohyashiki, Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells, *Neurosci Lett* 317 (2002) 61-64.
 - [488] J. Takala, E. Ruokonen, N.R. Webster, M.S. Nielsen, D.F. Zandstra, G. Vundelinckx, C.J. Hinds, Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults, *N Engl J Med* 341 (1999) 785-792.
 - [489] R. Takeshima, J.R. Kirsch, R.C. Koehler, A.W. Gomoll, R.J. Traystman, Monoclonal leukocyte antibody does not decrease the injury of transient focal cerebral ischemia in cats, *Stroke* 23 (1992) 247-252.
 - [490] S.M. Taubenfeld, M.H. Milekic, B. Monti, C.M. Alberini, The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta, *Nat Neurosci* 4 (2001) 813-818.
 - [491] V. Tayal, B.S. Kalra, Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update, *Eur J Pharmacol* 579 (2008) 1-12.
 - [492] T.S. Tengku-Muhammad, T.R. Hughes, H. Ranki, A. Cryer, D.P. Ramji, Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines, *Cytokine* 12 (2000) 1430-1436.
 - [493] N. Terrando, C. Monaco, D. Ma, B.M. Foxwell, M. Feldmann, M. Maze, Tumor necrosis factor-alpha triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 20518-20522.
 - [494] C. Thery, A. Dobbertin, M. Mallat, Downregulation of in vitro neurotoxicity of brain macrophages by prostaglandin E2 and a beta-adrenergic agonist, *Glia* 11 (1994) 383-386.
 - [495] A.W. Thomson, Academic Press, Amsterdam { u.a., 2003, XXVII, 643 - 1396, XXX-LXVII S. pp.
 - [496] M. Tidswell, W. Tillis, S.P. Larosa, M. Lynn, A.E. Wittek, R. Kao, J. Wheeler, J. Gogate, S.M. Opal, Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis, *Crit Care Med* 38 (2010) 72-83.
 - [497] H. Tilg, E. Trehu, M.B. Atkins, C.A. Dinarello, J.W. Mier, Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55, *Blood* 83 (1994) 113-118.
 - [498] K.J. Tracey, Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway, *J Clin Invest* 117 (2007) 289-296.
 - [499] C. Trautwein, C. Caelles, P. van der Geer, T. Hunter, M. Karin, M. Chojkier, Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain, *Nature* 364 (1993) 544-547.
 - [500] S. Trzeciak, J.V. McCoy, R. Phillip Dellinger, R.C. Arnold, M. Rizzuto, N.L. Abate, N.I. Shapiro, J.E. Parrillo, S.M. Hollenberg, Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis, *Intensive Care Med* 34 (2008) 2210-2217.

- [501] K. Tsoyi, H.J. Jang, J.W. Kim, H.K. Chang, Y.S. Lee, H.O. Pae, H.J. Kim, H.G. Seo, J.H. Lee, H.T. Chung, K.C. Chang, Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine attenuates inflammatory response in macrophages and improves survival in experimental model of sepsis through heme oxygenase-1 induction, *Antioxid Redox Signal* 14 (2011) 2057-2070.
- [502] K. Tyml, X. Wang, D. Lidington, Y. Ouellette, Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (2001) H1397-1406.
- [503] M. Tzanela, S.E. Orfanos, M. Tsirantonaki, A. Kotanidou, C. Sotiropoulou, M. Christophoraki, D. Vassiliadi, N.C. Thalassinou, C. Roussos, Leptin alterations in the course of sepsis in humans, *In Vivo* 20 (2006) 565-570.
- [504] N.D. Ubag, J.H. Vernooy, E. Burg, C. Hayes, J. Bement, E. Dilli, L. Zabeau, E. Abraham, K.R. Poch, J.A. Nick, O. Dienz, J. Zuniga, M.J. Wargo, J.P. Mizgerd, J. Tavernier, M. Rincon, M.E. Poynter, E.F. Wouters, B.T. Suratt, The role of leptin in the development of pulmonary neutrophilia in infection and acute lung injury, *Crit Care Med* 42 (2014) e143-151.
- [505] M. Ueki, G. Mies, K.A. Hossmann, Effect of alpha-chloralose, halothane, pentobarbital and nitrous oxide anesthesia on metabolic coupling in somatosensory cortex of rat, *Acta Anaesthesiol Scand* 36 (1992) 318-322.
- [506] S. Uematsu, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway, *J Immunol* 168 (2002) 5811-5816.
- [507] L. Ulloa, The cholinergic anti-inflammatory pathway meets microRNA, *Cell Res* 23 (2013) 1249-1250.
- [508] J.G. Umans, M.E. Wylam, R.W. Samsel, J. Edwards, P.T. Schumacker, Effects of endotoxin in vivo on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta, *Am Rev Respir Dis* 148 (1993) 1638-1645.
- [509] T. Valente, P. Mancera, J.M. Tusell, J. Serratos, J. Saura, C/EBPbeta expression in activated microglia in amyotrophic lateral sclerosis, *Neurobiol Aging* 33 (2012) 2186-2199.
- [510] L. Vallieres, S. Rivest, Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta, *J Neurochem* 69 (1997) 1668-1683.
- [511] J. Van Damme, G. Opdenakker, R.J. Simpson, M.R. Rubira, S. Cayphas, A. Vink, A. Billiau, J. Van Snick, Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor, *J Exp Med* 165 (1987) 914-919.
- [512] T. van der Poll, S.M. Opal, Host-pathogen interactions in sepsis, *Lancet Infect Dis* 8 (2008) 32-43.
- [513] P. Van Der Voorn, J. Tekstra, R.H. Beelen, C.P. Tensen, P. Van Der Valk, C.J. De Groot, Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions, *Am J Pathol* 154 (1999) 45-51.
- [514] B.K. Van Weemen, A.H. Schuurs, Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS Lett* 15 (1971) 232-236.

- [515] D.J. van Westerloo, I.A. Giebelen, S. Florquin, J. Daalhuisen, M.J. Bruno, A.F. de Vos, K.J. Tracey, T. van der Poll, The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis, *J Infect Dis* 191 (2005) 2138-2148.
- [516] F. Venet, C.S. Chung, H. Kherouf, A. Geeraert, C. Malcus, F. Poitevin, J. Bohe, A. Lepape, A. Ayala, G. Monneret, Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients, *Intensive Care Med* 35 (2009) 678-686.
- [517] S. Verma, R. Nakaoke, S. Dohgu, W.A. Banks, Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide, *Brain Behav Immun* 20 (2006) 449-455.
- [518] R. Vezza, R. Roberti, G.G. Nenci, P. Gresele, Prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation by priming protein kinase C, *Blood* 82 (1993) 2704-2713.
- [519] G. Vida, G. Pena, E.A. Deitch, L. Ulloa, alpha7-cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine, *J Immunol* 186 (2011) 4340-4346.
- [520] D. Vigier, A. Rouviere, Afferent and efferent connections of the area postrema demonstrated by the horseradish peroxidase method, *Arch Ital Biol* 117 (1979) 325-339.
- [521] P. Villa, C.L. Shaklee, C. Meazza, D. Agnello, P. Ghezzi, G. Senaldi, Granulocyte colony-stimulating factor and antibiotics in the prophylaxis of a murine model of polymicrobial peritonitis and sepsis, *J Infect Dis* 178 (1998) 471-477.
- [522] J.L. Vincent, Clinical sepsis and septic shock--definition, diagnosis and management principles, *Langenbecks Arch Surg* 393 (2008) 817-824.
- [523] M.B. Voisin, S. Nourshargh, Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls, *J Innate Immun* 5 (2013) 336-347.
- [524] J.M. Waldburger, D.L. Boyle, V.A. Pavlov, K.J. Tracey, G.S. Firestein, Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor, *Arthritis Rheum* 58 (2008) 3439-3449.
- [525] C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, A.S. Baldwin, Jr., NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science* 281 (1998) 1680-1683.
- [526] H. Wang, H. Liao, M. Ochani, M. Justiniani, X. Lin, L. Yang, Y. Al-Abed, C. Metz, E.J. Miller, K.J. Tracey, L. Ulloa, Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis, *Nat Med* 10 (2004) 1216-1221.
- [527] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J.H. Li, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C.J. Czura, K.J. Tracey, Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation, *Nature* 421 (2003) 384-388.
- [528] K. Wang, C. Zheng, C. Wu, M. Gao, Q. Liu, K. Yang, K. Ellsworth, L. Xu, J. Wu, alpha-Chloralose diminishes gamma oscillations in rat hippocampal slices, *Neurosci Lett* 441 (2008) 66-71.
- [529] Q. Wang, Y. Cheng, F.S. Xue, Y.J. Yuan, J. Xiong, R.P. Li, X. Liao, J.H. Liu, Postconditioning with vagal stimulation attenuates local and systemic inflammatory responses to myocardial ischemia reperfusion injury in rats, *Inflamm Res* 61 (2012) 1273-1282.
- [530] L.B. Ware, M.A. Matthay, The acute respiratory distress syndrome, *N Engl J Med* 342 (2000) 1334-1349.

- [531] B.L. Warren, A. Eid, P. Singer, S.S. Pillay, P. Carl, I. Novak, P. Chalupa, A. Atherstone, I. Penzes, A. Kubler, S. Knaub, H.O. Keinecke, H. Heinrichs, F. Schindel, M. Juers, R.C. Bone, S.M. Opal, Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial, *JAMA* 286 (2001) 1869-1878.
- [532] L.R. Watkins, L.E. Goehler, J.K. Relton, N. Tartaglia, L. Silbert, D. Martin, S.F. Maier, Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication, *Neurosci Lett* 183 (1995) 27-31.
- [533] L.R. Watkins, S.F. Maier, L.E. Goehler, Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms, *Life Sci* 57 (1995) 1011-1026.
- [534] L.R. Watkins, E.P. Wiertelak, L.E. Goehler, K. Mooney-Heiberger, J. Martinez, L. Furness, K.P. Smith, S.F. Maier, Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia, *Brain Res* 639 (1994) 283-299.
- [535] M.F. Werner, D. Fraga, M.C. Melo, G.E. Souza, A.R. Zamprônio, Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection, *Inflamm Res* 52 (2003) 291-296.
- [536] D.E. Wesche, J.L. Lomas-Neira, M. Perl, C.S. Chung, A. Ayala, Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock, *J Leukoc Biol* 78 (2005) 325-337.
- [537] W.J. Wiersinga, S.J. Leopold, D.R. Cranendonk, T. van der Poll, Host innate immune responses to sepsis, *Virulence* 5 (2014) 36-44.
- [538] T.J. Williams, Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation, *Br J Pharmacol* 65 (1979) 517-524.
- [539] J. Witowski, K. Pawlaczyk, A. Breborowicz, A. Scheuren, M. Kuzlan-Pawlaczyk, J. Wisniewska, A. Polubinska, H. Friess, G.M. Gahl, U. Frei, A. Jorres, IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells, *J Immunol* 165 (2000) 5814-5821.
- [540] H. Wolburg, K. Wolburg-Buchholz, B. Engelhardt, Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact, *Acta Neuropathol* 109 (2005) 181-190.
- [541] F. Wu, W. Cao, Y. Yang, A. Liu, Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice, *Histochem Cell Biol* 133 (2010) 313-322.
- [542] Y.X. Xiang, W.X. Wang, Z. Xue, L. Zhu, S.B. Wang, Z.H. Sun, Electrical stimulation of the vagus nerve protects against cerebral ischemic injury through an anti-inflammatory mechanism, *Neural Regen Res* 10 (2015) 576-582.
- [543] L. Xie, G.R. Choudhury, A. Winters, S.H. Yang, K. Jin, Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10, *Eur J Immunol* 45 (2015) 180-191.
- [544] H. Xu, J.A. Gonzalo, Y. St Pierre, I.R. Williams, T.S. Kupper, R.S. Cotran, T.A. Springer, J.C. Gutierrez-Ramos, Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice, *J Exp Med* 180 (1994) 95-109.
- [545] J. Xu, M. Chalimoniuk, Y. Shu, A. Simonyi, A.Y. Sun, F.A. Gonzalez, G.A. Weisman, W.G. Wood, G.Y. Sun, Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines,

- extracellular ATP, and oxidative agents, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69 (2003) 437-448.
- [546] K. Yamagata, K.I. Andreasson, W.E. Kaufmann, C.A. Barnes, P.F. Worley, Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids, *Neuron* 11 (1993) 371-386.
- [547] J. Yang, X. Liao, M.K. Agarwal, L. Barnes, P.E. Auron, G.R. Stark, Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB, *Genes Dev* 21 (2007) 1396-1408.
- [548] L. Yang, R.M. Froio, T.E. Sciuto, A.M. Dvorak, R. Alon, F.W. Luscinskas, ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow, *Blood* 106 (2005) 584-592.
- [549] Z. Yao, W.C. Fanslow, M.F. Seldin, A.M. Rousseau, S.L. Painter, M.R. Comeau, J.I. Cohen, M.K. Spriggs, Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor, *Immunity* 3 (1995) 811-821.
- [550] Z. Yao, S.L. Painter, W.C. Fanslow, D. Ulrich, B.M. Macduff, M.K. Spriggs, R.J. Armitage, Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells, *J Immunol* 155 (1995) 5483-5486.
- [551] S.J. Yarwood, G. Borland, W.A. Sands, T.M. Palmer, Identification of CCAAT/enhancer-binding proteins as exchange protein activated by cAMP-activated transcription factors that mediate the induction of the SOCS-3 gene, *J Biol Chem* 283 (2008) 6843-6853.
- [552] H. Yoshikawa, M. Kurokawa, N. Ozaki, K. Nara, K. Atou, E. Takada, H. Kamochi, N. Suzuki, Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7, *Clin Exp Immunol* 146 (2006) 116-123.
- [553] G.B. Young, C.F. Bolton, Y.M. Archibald, T.W. Austin, G.A. Wells, The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy, *J Clin Neurophysiol* 9 (1992) 145-152.
- [554] C.A. Zahnow, CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases, *Expert Rev Mol Med* 11 (2009) e12.
- [555] H. Zarkesh-Esfahani, A.G. Pockley, Z. Wu, P.G. Hellewell, A.P. Weetman, R.J. Ross, Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha, *J Immunol* 172 (2004) 1809-1814.
- [556] A. Zauner, W.P. Daugherty, M.R. Bullock, D.S. Warner, Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology, *Neurosurgery* 51 (2002) 289-301; discussion 302.
- [557] C. Zauner, A. Gendo, L. Kramer, G.C. Funk, E. Bauer, P. Schenk, K. Ratheiser, C. Madl, Impaired subcortical and cortical sensory evoked potential pathways in septic patients, *Crit Care Med* 30 (2002) 1136-1139.
- [558] L. Zhang, J.S. Cardinal, P. Pan, B.R. Rosborough, Y. Chang, W. Yan, H. Huang, T.R. Billiar, M.R. Rosengart, A. Tsung, Splenocyte apoptosis and autophagy is mediated by interferon regulatory factor 1 during murine endotoxemia, *Shock* 37 (2012) 511-517.
- [559] M. Zhang, X. Wang, X. Hou, P. Teng, Y. Jiang, L. Zhang, X. Yang, J. Tian, G. Li, J. Cao, H. Xu, Y. Li, Y. Wang, Oxymatrine protects against myocardial injury via inhibition of JAK2/STAT3 signaling in rat septic shock, *Mol Med Rep* 7 (2013) 1293-1299.

- [560] R. Zhang, N. Wugeti, J. Sun, H. Yan, Y. Guo, L. Zhang, M. Ma, X. Guo, C. Jiao, W. Xu, T. Li, H. Liu, Y. Ma, Effects of vagus nerve stimulation via cholinergic anti-inflammatory pathway activation on myocardial ischemia/reperfusion injury in canine, *Int J Clin Exp Med* 7 (2014) 2615-2623.
- [561] Y. Zhang, W.N. Rom, Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs, *Mol Cell Biol* 13 (1993) 3831-3837.
- [562] Z. Zhang, J.L. Bryan, E. DeLassus, L.W. Chang, W. Liao, L.J. Sandell, CCAAT/enhancer-binding protein beta and NF-kappaB mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1beta, *J Biol Chem* 285 (2010) 33092-33103.
- [563] X. Zhao, S. Zhuang, Y. Chen, G.R. Boss, R.B. Pilz, Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates CCAAT enhancer-binding protein beta functions through inhibition of glycogen synthase kinase-3, *J Biol Chem* 280 (2005) 32683-32692.
- [564] Y.J. Zhao, W.J. Yi, X.J. Wan, J. Wang, T.Z. Tao, J.B. Li, J.F. Wang, X.M. Deng, Blockade of ICAM-1 improves the outcome of polymicrobial sepsis via modulating neutrophil migration and reversing immunosuppression, *Mediators Inflamm* 2014 (2014) 195290.
- [565] Y.X. Zhao, W. He, X.H. Jing, J.L. Liu, P.J. Rong, H. Ben, K. Liu, B. Zhu, Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation protects endotoxemic rat from lipopolysaccharide-induced inflammation, *Evid Based Complement Alternat Med* 2012 (2012) 627023.
- [566] Z. Zhong, Z. Wen, J.E. Darnell, Jr., Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6, *Science* 264 (1994) 95-98.
- [567] H. Zhou, G. Andonegui, C.H. Wong, P. Kubes, Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation, *J Immunol* 183 (2009) 5244-5250.
- [568] J. Zhou, D. Pavlovic, J. Willecke, C. Friedel, S. Whynot, O. Hung, V. Cerny, H. Schroeder, M. Wendt, R. Shukla, C. Lehmann, Activated protein C improves pial microcirculation in experimental endotoxemia in rats, *Microvasc Res* 83 (2012) 276-280.
- [569] L. Zhou, J. Lin, G. Kui, J. Zhang, Y. Yu, Neuroprotective effects of vagus nerve stimulation on traumatic brain injury, *Neural Regen Res* 9 (2014) 1585-1591.
- [570] S. Zhu, K. Yoon, E. Sterneck, P.F. Johnson, R.C. Smart, CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 207-212.
- [571] M. Ziaja, Septic encephalopathy, *Curr Neurol Neurosci Rep* 13 (2013) 383.
- [572] A. Ziomber, K. Juszczak, J. Kaszuba-Zwoinska, A. Machowska, K. Zaraska, K. Gil, P. Thor, Magnetically induced vagus nerve stimulation and feeding behavior in rats, *J Physiol Pharmacol* 60 (2009) 71-77.
- [573] A. Zlotnik, O. Yoshie, Chemokines: a new classification system and their role in immunity, *Immunity* 12 (2000) 121-127.
- [574] M. Zonta, M.C. Angulo, S. Gobbo, B. Rosengarten, K.A. Hossmann, T. Pozzan, G. Carmignoto, Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation, *Nat Neurosci* 6 (2003) 43-50.

IX. Anhang

1 Eigene Publikationen

Originalarbeiten in Fachzeitschriften:

Schweighöfer H, Rummel C, Mayer K, Rosengarten B (2014) Brain function in iNOS knock out or iNOS inhibited (I-NIL) mice under endotoxic shock. Intensive Care Medicine Experimental 2:24.

Mihaylova S, Schweighöfer H, Hackstein H, Rosengarten B (2014) Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation in endotoxemic rats on blood and spleen lymphocyte subsets. Inflamm Res 63:683-690.

Zur Publikation eingereicht:

Rummel C, Bredehöft J, Damm J, Schweighöfer H, Peek V, Harden L (2015) Influence of obesity on fever and sickness behavior during systemic inflammation. Physiology, submitted 23.10.2015, Y-00049-2015

In Vorbereitung:

Schweighöfer H, Rummel C, Roth J, Rosengarten B Effects of vagus nerve stimulation on neurophysiological parameters and the cellular immune response in the rat brain during systemic inflammation.

Veröffentlichte Abstracts:

Schweighöfer H, Rummel C, Roth J, Rosengarten B (2015) Effects of vagus nerve stimulation on neurophysiological parameters and the cellular immune response in the rat brain during endotoxemia. Brain Behavior and Immunity 49, Supplement:e8

2 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, die zur Vollendung dieses Werkes beigetragen haben!

Zunächst danke ich Prof. Dr. Rosengarten für die Überlassung dieses spannenden Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Vielen Dank für die rundum gute Betreuung während des gesamten Entstehungsprozess dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Roth für die zusätzliche Betreuung und fachliche Beratung. Ein großes Danke schön auch an PD Dr. Rummel, der stets ein offenes Ohr für Fragen hatte und mir in allen Situationen bereitwillig und mit viel Engagement behilflich war.

Bei Herrn Kaschtanow bedanke ich mich für die kompetente Einarbeitung in das tierexperimentelle Arbeiten und bei den Kollegen aus dem ECCPs für die Hilfe in allen alltäglichen Laborangelegenheiten. Des Weiteren Danke ich Prof. Dr. Grau, Frau Fuchs-Moll und Frau Petri für die großzügige Unterstützung bei der Analyse der T-Lymphozyten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerstberger und allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Physiologie und -Biochemie für die „Adoption“ an Ihrem Institut und die Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken. Insbesondere danke ich dabei Doreen Marks, Jolanta Murgott und Daniela Ott für die großartige Unterstützung bei der Laborarbeit. Ein weiterer Dank gilt Dr. Jenny Schneiders für die geduldige und kompetente Beantwortung aller Fragen. Weiterhin danke ich meinen Kollegen Verena, Björn, Janne, Carmen, Sybille, Sandra, Thomas und dem Rest der Frühstücksrunde für eine schöne und lustige Arbeitsatmosphäre und eine gute Zeit während meiner Doktorarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Kiwi, für die vielen unterhaltsamen Momente, die ein wenig Abwechslung in den Alltag brachten.

Zusätzlich möchte ich mich beim GGL bedanken, dass mir durch sein vielfältiges Angebot neben meiner Arbeit eine fachliche Weiterentwicklung ermöglichte.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Eltern, die mich während meiner Zeit als Doktorandin mental sowie finanziell unterstützt haben.

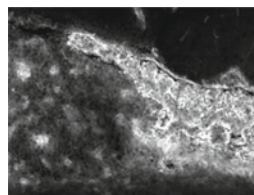
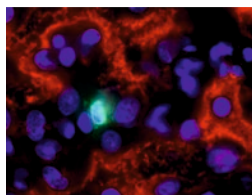
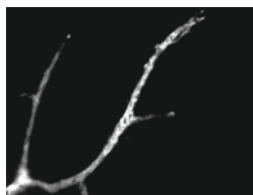
Schlussendlich möchte ich meinem Freund Sören danken, der mich in allen Lebenslagen liebt, unterstützt, motiviert, aufbaut und für mich da ist.

Vielen Dank!

3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Hanna Schweighöfer



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6425-9



9 783835 196425 9